

Научный рецензируемый журнал

ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

Основан в 1997 г.

Периодичность 8 выпусков в год

Учредители

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

Межрегиональная общественная организация Вавиловское общество генетиков и селекционеров

Сибирское отделение Российской академии наук

Главный редактор

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

Заместители главного редактора

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

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. Керкис – д-р наук (Бразилия)
А.В. Кильчевский – чл.-кор. НАНБ, д-р биол. наук (Беларусь)
С.В. Костров – чл.-кор. РАН, д-р хим. наук (Россия)
Ж. Ле Гуи – д-р наук (Франция)
Б. Люгтенберг – д-р наук, проф. (Нидерланды)
В.И. Молодин – академик РАН, д-р ист. наук (Россия)
В.П. Пузырев – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)
А.Ю. Ржецкий – канд. биол. наук, проф. (США)
И.Б. Рогозин – канд. биол. наук (США)
А.О. Рувинский – д-р биол. наук, проф. (Австралия)
К.Г. Скрябин – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)
К.В. Славин – д-р наук, проф. (США)
И.А. Тихонович – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)
Л.В. Хотылева – академик НАНБ, д-р биол. наук (Беларусь)
Э.К. Хуснутдинова – д-р биол. наук, проф. (Россия)
М.Ф. Чернов – д-р мед. наук (Япония)
С.В. Шестаков – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)
Н.К. Янковский – 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. Афтanas – 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)

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii

Founded in 1997

Published 8 times annually

Founders

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

The Vavilov Society of Geneticists and Breeders

Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

Editor-in-Chief

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

Deputy Editor-in-Chief

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

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, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia

L.A. Beshpalova, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Agricul.), Russia

A. Börner, Dr. Sci., Germany

M.F. Chernov, Dr. Sci. (Medicine), Japan

G.L. Dianov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Great Britain

Yu.E. Dubrova, Professor, Dr. Sci. (Biology), Great Britain

V.M. Govorun, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

J. Le Gouis, Dr. Sci., France

I. Grosse, Professor, Dr. Sci., Germany

S.G. Inge-Vechtomov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

I.E. Kerkis, Dr. Sci., Brazil

L.V. Khotyleva, Full Member of the NAS of Belarus, Dr. Sci. (Biology), Belarus

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

A.V. Kilchevsky, Corr. Member of the NAS of Belarus, Dr. Sci. (Biology), Belarus

S.V. Kostrov, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Chemistry), Russia

B. Lugtenberg, Professor, Dr. Sci., Netherlands

V.I. Molodin, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (History), Russia

V.P. Puzyrev, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia

I.B. Rogozin, Cand. Sci. (Biology), United States

A.O. Ruvinsky, Professor, Dr. Sci. (Biology), Australia

A.Yu. Rzhetsky, Professor, Cand. Sci. (Biology), United States

S.V. Shestakov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

K.G. Skryabin, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

K.V. Slavin, Professor, Dr. Sci., United States

I.A. Tikhonovich, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

N.K. Yankovsky, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

I.K. Zakharov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

I.A. Zakharov-Gezekhus, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

Editorial board

D.A. Afonnikov, Associate Professor, Cand. Sci. (Biology), Russia

L.I. Aftanas, Full Member of the RAS, 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, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

T.A. Gavrilenko, Associate Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

S.L. Kiselev, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

A.V. Kochetov, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

Yu.M. Konstantinov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

V.A. Kozlov, Full Member of the RAS, 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, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Physics and Mathem.), Russia

M.P. Moshkin, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

N.A. Provorov, Dr. Sci. (Biology), Russia

D.V. Pyshnyi, Corr. Member of the RAS, 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, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

M.I. Voevoda, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia

Генетика человека

- 290 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Полиморфизм гена холодового рецептора *TRPM8* у коренного населения Сибири: возможное адаптивное значение полиморфизма rs11563208 на северо-востоке Азии
Б.А. Мальярчук, М.В. Деренко

- 296 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Некоторые аспекты ассоциации генов с высокими спортивными достижениями
И.Б. Моссэ, А.В. Кильчевский, Л.А. Кундас, А.Л. Гончар, С.Л. Минин, К.В. Жур

Физиологическая генетика

- 304 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Эффективность ольфакторного транспорта наночастиц оксида марганца (II) при однократном или многократном интраназальном введении
А.В. Ромащенко, М.Б. Шарапова, Д.В. Петровский, М.П. Мошкин
- 312 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Механизмы патогенеза трематодозов: присутствие секреторных белков кошачьей двуустки *Opisthorchis felineus* в тканях желчного пузыря у больных хроническим описторхозом
М.Ю. Пахарукова, А.В. Ковнер, А.Н. Триголубов, Е.Н. Федин, Е.С. Михайлова, С.Г. Штофин, А.И. Аутеншлюс, В.А. Мордвинов

- 317 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Кандидатные антиревматические плазмидные конструкции обладают низкой иммуногенностью
Т.С. Непомнящих, Т.В. Трегубчак, С.Н. Якубицкий, О.С. Таранов, Р.А. Максютлов, С.Н. Щелкунов

Генетика и селекция растений

- 323 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Анализ полиморфизма экзона-4 гена *VERNALIZATION-A1* у видов полиплоидной пшеницы
А.Ф. Мутерко, Е.А. Салина

334

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Идентификация и характеристика мРНК генов рецептор-подобных киназ *MhyGSO1* и *MhyGSO2* в паразитическом растении *Monotropa hypopitys* на стадии цветения
А.В. Щенникова, Е.З. Кочиева, А.В. Белецкий, М.А. Филюшин, О.А. Шульга, Н.В. Равин, К.Г. Скрябин

341

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Создание нового для мягкой пшеницы генотипа – носителя двух локусов мягкозерности эндосперма
А.В. Симонов, А.К. Чистякова, Е.В. Морозова, Л.В. Щукина, А. Бёрнер, Т.А. Пшеничникова

347

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Оценка линий синтетической пшеницы (*Triticum durum/Aegilops tauschii*) по вегетационному периоду и устойчивости к болезням
В.П. Шаманин, И.В. Потоцкая, С.С. Шепелев, В.Е. Пожерукова, А.Ю. Трущенко, А.С. Чурсин, А.И. Моргунов

Филогенетика

354

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Изменчивость и межпопуляционная дифференциация редкого вида *Gueldenstaedtia monophylla* Fisch. (Fabaceae)
И.Ю. Селютин, Е.С. Кониченко, О.В. Дорогина

360

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Различия между некоторыми видами рода *Ulva*, выявленные путем морфологического, генетического и биохимического анализа
М.М. Исмаил, С.Э. Мохамед

368

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Порядок митохондриальных генов как дополнительный маркер в филогенетических исследованиях насекомых
Ф.С. Шарко, А.В. Недолужко, С.М. Расторгуев, С.В. Цыганкова, Е.С. Булыгина, А.А. Полилов, Е.Б. Прохорчук, К.Г. Скрябин

374

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Генетическое разнообразие видов комплекса *Aporrectodea caliginosa* на территории России
С.В. Шеховцов, Е.В. Голованова, Н.Э. Базарова, Ю.Н. Белова, Д.И. Берман, Е.А. Держинский, М.П. Шашков, С.Е. Пельтек

Human genetics

- 290 **ORIGINAL ARTICLE**
Polymorphism of the cold receptor gene *TRPM8* in native populations of Siberia: putative selective role of rs11563208 polymorphism in Northeast Asia
B.A. Malyarchuk, M.V. Derenko

- 296 **ORIGINAL ARTICLE**
Some aspects of gene association with high sport achievements
I.B. Mosse, A.V. Kilchevsky, L.A. Kundas, A.L. Gonchar, S.L. Minin, K.V. Zhur

Physiological genetics

- 304 **ORIGINAL ARTICLE**
Olfactory transport efficiency of the manganese oxide nanoparticles (II) after their single or multiple intranasal administrations
A.V. Romashchenko, M.B. Sharapova, D.V. Petrovskii, M.P. Moshkin

- 312 **ORIGINAL ARTICLE**
Mechanisms of trematodiasis pathogenicity: the presence of the secretory proteins from the liver fluke *Opisthorchis felinus* in the gallbladder tissues of the patients with chronic opisthorchiasis
M.Y. Pakharukova, A.V. Kovner, A.N. Trigolubov, E.N. Fedin, E.S. Mikhailova, S.G. Shtofin, A.I. Autenshlyus, V.A. Mordvinov

- 317 **ORIGINAL ARTICLE**
Candidate antirheumatic genotherapeutic plasmid constructions have low immunogenicity
T.S. Nepomnyashchikh, T.V. Tregubchak, S.N. Yakubitskiy, O.S. Taranov, R.A. Maksyutov, S.N. Shchelkunov

Plant genetics and breeding

- 323 **ORIGINAL ARTICLE**
Analysis of the *VERNALIZATION-A1* exon-4 polymorphism in polyploid wheat
A.F. Muterko, E.A. Salina

- 334 **ORIGINAL ARTICLE**
Identification and characterization of mRNAs of receptor-like kinases MhyGSO1 and MhyGSO2 in flowering parasitic plant *Monotropa hypopitys*
A.V. Shchennikova, E.Z. Kochieva, A.V. Beletsky, M.A. Filyushin, O.A. Shulga, N.V. Ravin, K.G. Skryabin

- 341 **ORIGINAL ARTICLE**
The development of a new bread wheat genotype carrying two loci for endosperm softness
A.V. Simonov, A.K. Chistyakova, E.V. Morozova, L.V. Shchukina, A. Börner, T.A. Pshenichnikova

- 347 **ORIGINAL ARTICLE**
Evaluation of synthetic wheat lines (*Triticum durum/Aegilops tauschii*) for vegetative period and resistance to diseases
V.P. Shamanin, I.V. Pototskaya, S.S. Shepelev, V.E. Pozherukova, A.Yu. Truschenko, A.S. Chursin, A.I. Morgunov

Phylogenetics

- 354 **ORIGINAL ARTICLE**
Variability and interpopulation differentiation of the rare species *Gueldenstaedtia monophylla* Fisch. (Fabaceae)
I.Yu. Selyutina, E.S. Konichenko, O.V. Dorogina

- 360 **ORIGINAL ARTICLE**
Differentiation between some *Ulva* spp. by morphological, genetic and biochemical analyses
M.M. Ismail, S.E. Mohamed

- 368 **ORIGINAL ARTICLE**
The mitochondrial gene order and *CYTB* gene evolution in insects
F.S. Sharko, A.V. Nedoluzhko, S.M. Rastorguev, S.V. Tsygankova, E.S. Boulygina, A.A. Polilov, E.B. Prokhortchouk, K.G. Skryabin

- 374 **ORIGINAL ARTICLE**
Genetic diversity of the *Aporrectodea caliginosa* complex in Russia
S.V. Shekhovtsov, E.V. Golovanova, N.E. Bazarova, Yu.N. Belova, D.I. Berman, E.A. Derzhinsky, M.P. Shashkov, S.E. Peltek



Уважаемые коллеги, дорогие читатели!
В текущем номере журнала вашему вниманию предложены результаты экспериментальных работ по ключевым направлениям генетики.

Рубрика «Генетика человека» представлена двумя статьями, в первой из которых рассматривается вариант гена *TRPM8*, имеющий адаптационное значение для коренного населения Сибири, а во второй – обсуждаются генетические аспекты высоких спортивных достижений.

В статьях по направлению «Генетика и селекция растений» приводятся новые данные о наследовании признаков пшеницы, связанных с типом развития, продуктивностью и устойчивостью к заболеваниям. Уделено внимание генетическому разнообразию редких видов растений, филогенетическим отношениям внутри одного из родов водорослей, а также генетическому контролю развития паразитических растений.

Результаты экспериментальных работ на животных изложены в разделах «Физиологическая генетика» и «Филогенетика». Приведены свидетельства о наличии естественных механизмов защиты ольфакторного эпителия от проникновения патогенов и ксенобиотиков. Получены данные, важные для понимания молекулярных механизмов патогенеза описторхоза, а также для усовершенствования методов иммунодиагностики описторхоза и ассоциированных с ним заболеваний. Предложен новый методический прием филогенетического анализа насекомых. Обобщены сведения о генетическом разнообразии дождевых червей на территории России.

Второго апреля отметила юбилей академик Людмила Андреевна Беспалова. Видный ученый в области генетики, селекции и семеноводства зерновых культур, Л.А. Беспалова в настоящее время является одним из ведущих селекционеров России. Она автор 129 высокоурожайных, обладающих высоким качеством зерна, сортов пшеницы и тритикале. За большой вклад в аграрную науку, подготовку высококвалифицированных кадров, обеспечение продовольственной безопасности страны Л.А. Беспалова отмечена высокими правительственными наградами и званиями (см. статью о юбилеере в Письмах в Вавиловский журнал: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/anniversary/appx5.pdf>). Редакция журнала сердечно поздравляет Людмилу Андреевну Беспалову, члена редакционного совета «Вавиловского журнала генетики и селекции», с юбилеем и желает новых творческих свершений!

Следующий номер журнала будет посвящен эволюционной генетике и доместикации. В 2017 году исполняется 100 лет со дня рождения выдающегося ученого, генетика-эволюциониста, действительного члена Академии наук СССР Дмитрия Константиновича Беляева (1917–1985). К этому событию приурочена Международная конференция «Беляевские чтения», которая будет проходить с 7 по 10 августа на базе Института цитологии и генетики СО РАН (<http://conf.bionet.nsc.ru/belyaev100/>). В рамках мероприятия запланировано открытие мемориальной скульптурной композиции «Д.К. Беляев с доместцированной лисицей» (<http://icg.nsc.ru/belyaev100/>) как дань памяти великому ученому и уникальному научному эксперименту.

В текущем году на страницах журнала найдет отражение и другое знаменательное событие – 60-летие Института цитологии и генетики СО РАН.

Академик РАН В.К. Шумный

Полиморфизм гена холодого рецептора *TRPM8* у коренного населения Сибири: возможное адаптивное значение полиморфизма rs11563208 на северо-востоке Азии

Б.А. Малярчук , М.В. Деренко

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологических проблем Севера Дальневосточного отделения Российской академии наук, Магадан, Россия

Ген *TRPM8* кодирует холодого рецептор TRPM8, имеющий большое значение в процессах адаптации к холоду, а также в процессах метаболизма и иммунного ответа. Ранее было обнаружено, что варианты полиморфизма гена *TRPM8*, распространенные в популяциях человека, ассоциируются с различной чувствительностью к холоду. В настоящей работе исследована изменчивость всех экзонов и прилегающих интронных последовательностей этого гена в выборках коренного населения Сибири, представляющего региональные группы Северо-Восточной, Центральной, Южной и Западной Сибири. Из 21 вариабельного локуса в девяти случаях частота производных аллелей составила более 10 % (локусы rs28901637, rs11562975, rs10929319, rs28901644, rs7593557, rs12185590, rs10171428, rs11563208, rs11563071). Различные варианты этих наиболее частых у коренного населения Сибири полиморфных локусов формируют 26 гаплотипов. Помимо общих для всех региональных выборок гаплотипов (7 гаплотипов, распространенных с частотой 2–28 %), в каждой из проанализированных выборок выявлены уникальные гаплотипы. Из них большой интерес представляет гаплотип, характеризующийся производным аллелем Т в локусе rs11563208 и распространенный с частотой 14 % на северо-востоке Азии (у коряков и чукчей). Синонимичная замена в локусе rs11563208 может иметь функциональное значение, поскольку соответствующая этому локусу аминокислота (изолейцин в позиции 1016 белка TRPM8) расположена в функционально важном TRP-домеине и, следовательно, может повлиять на процессы терморецепции. Предполагается также, что появление гаплотипа, несущего аллель rs11563208-Т, обусловлено необходимостью противодействовать ингибированию рецепторов TRPM8 со стороны полиненасыщенных жирных кислот, которыми обогащена традиционная диета коренного населения северо-востока Азии (эскимосов, чукчей и коряков).

Ключевые слова: ген *TRPM8*; экзом; однонуклеотидные полиморфизмы; популяции человека; адаптивная эволюция.

Polymorphism of the cold receptor gene *TRPM8* in native populations of Siberia: putative selective role of rs11563208 polymorphism in Northeast Asia

B.A. Malyarchuk , M.V. Derenko

Institute of Biological Problems of the North FEB RAS, Magadan, Russia

The *TRPM8* gene encodes the cold-activated receptor TRPM8, which has an important role in cold adaptation as well as in metabolic and immune responses. Previously, it has been found that polymorphic variants of the *TRPM8* gene, which are present in human populations, are associated with different cold sensitivity. In the present study we have investigated variability of all exons and adjacent intronic sequences of this gene in samples of native populations of Siberia, including regional groups from Northeastern, Central, Southern and Western parts of Siberia. In 9 out of 21 variable loci revealed, the frequency of the derived alleles accounts for more than 10 % (loci rs28901637, rs11562975, rs10929319, rs28901644, rs7593557, rs12185590, rs10171428, rs11563208, and rs11563071). Different variants of these polymorphic loci, which are most frequent in native Siberians, generate 26 haplotypes. In addition to 7 haplotypes shared by all regional groups and present there at frequencies of 2–28 %, unique haplotypes were found in all regional samples. One of them characterized by derived allele T at rs11563208 locus is very interesting because it is spread at the frequency of 14 % only in Northeast Asia (in Koryaks and Chukchi). A synonymous substitution at rs11563208 locus may have a functional role because the amino acid residue (isoleucine at position 1016 of TRPM8 protein) corresponding to this locus is located in functionally important TRP-domain and, hence, it can influence thermoreception processes. It is assumed that the appearance of the haplotype carrying the rs11563208-T allele may be due to the necessity to counteract the inhibition of TRPM8 receptors by polyunsaturated fatty acids, which are typical of the traditional diet of native people of Northeast Asia (Siberian Eskimo, Chukchi and Koryaks).

Key words: gene *TRPM8*; exome; single nucleotide polymorphisms (SNP); human populations; adaptive evolution.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Малярчук Б.А., Деренко М.В. Полиморфизм гена холодого рецептора *TRPM8* у коренного населения Сибири: возможное адаптивное значение полиморфизма rs11563208 на северо-востоке Азии. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(3):290-295. DOI 10.18699/VJ17.246

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Malyarchuk B.A., Derenko M.V. Polymorphism of the cold receptor gene *TRPM8* in native populations of Siberia: putative selective role of rs11563208 polymorphism in Northeast Asia. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(3):290-295. DOI 10.18699/VJ17.246

Received 01.10.2016
Accepted for publication 08.02.2017
© AUTHORS, 2017

Холодовые рецепторы, относящиеся к семейству потенциал-зависимых катионных каналов TRP (transient receptor potential), имеют большое значение в процессах адаптации к низкой температуре окружающей среды (McKemy et al., 2002; Voets et al., 2004; Ramsey et al., 2006; Козырева, Воронова, 2014). Под влиянием различных факторов, в том числе температуры, происходят изменения в ионной проницаемости каналов, что в свою очередь приводит к изменениям мембранного потенциала. Наилучшим кандидатом для выявления специфических генетических изменений при адаптации к низким температурам представляется холодовой рецептор TRPM8 (Наумов и др., 2012; Козырева, Воронова, 2014). Этот рецептор активируется пониженной температурой (ниже 25 °C), некоторыми химическими агентами (ментолом, ицилином и эукалиптолом), а также фосфатидилинозитол-4,5-бифосфатом (PIP2) – сигнальным мембранным липидом (McKemy et al., 2002; Rohacs et al., 2005). В проведенных ранее исследованиях показано, что некоторые мутации в гене *TRPM8* человека ассоциируются с различной чувствительностью к холоду. Это установлено как на индивидуальном (Козырева, Воронова, 2014), так и на популяционном уровне (Потапова и др., 2008; Бабенко и др., 2015).

Ген холодового рецептора *TRPM8* человека представлен 27 экзонами, имеет размер примерно 102 тыс. пар нуклеотидов (т.п.н.) и расположен на хромосоме 2 в районе 2q37.1 (Tsavaler et al., 2001). Ионный канал TRPM8 сформирован четырьмя идентичными субъединицами белка. Каждая из них имеет шесть трансмембранных доменов, окружающих центральную ионную пору. N- и C-терминальные домены находятся в цитоплазме (Peier et al., 2002; Latorre et al., 2011). В C-терминальной части находится TRP-домен, включающий консервативные боксы TRP1 и TRP2, а также сайты связывания с ментолом и мембранным фосфолипидом PIP2. Экспрессия гена *TRPM8* происходит в клетках сенсорных нейронов.

Более ранние исследования изменчивости гена *TRPM8* основывались главным образом на анализе полиморфизма нескольких локусов однонуклеотидного полиморфизма (ОНП): локусов rs28901637 и rs11562975 в девяти этнических группах Северной Евразии и Америки (Потапова и др., 2008) и локусов rs13004520, rs28901637, rs11562975, rs7593557 и rs11563071 у киргизов в сравнении с данными Проекта 1000 геномов (Бабенко и др., 2015). Результаты исследований свидетельствуют о возможном селективном значении полиморфизма локуса rs11562975 при адаптации к холоду. Между тем вполне возможно, что селективное значение могут иметь и другие, пока не изученные локусы гена *TRPM8*. Для того чтобы получить такого рода информацию, в настоящей работе нами изучен полиморфизм экзонов и прилегающих интронных последовательностей гена *TRPM8* в выборках коренного населения Сибири.

Материалы и методы

Секвенирование экзотов 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 (3 коряка, 2 эвена и 1 эвенк). В качестве референтной последовательности использовали геномную сборку GRCh37.p13. Аннотацию вариантов полиморфизма выполняли с помощью сервера SeattleSeq Annotation.

В работе использованы также данные о полноэкзомном полиморфизме, сгенерированные из нуклеотидных последовательностей целых геномов от представителей коренного населения Северо-Восточной Азии (4 эскимоса, 5 чукчей и 16 коряков, по данным (Clemente et al., 2014)) и других регионов Сибири: Центральной Сибири (8 эвенов, 13 эвенков, 8 якутов), Южной Сибири (3 тувинца, 2 шорца, 6 алтайцев, 17 бурят, 6 монголов), Западной Сибири (3 кета, 3 ханта, 3 манси, 3 селькупы, 6 ненцев, 2 нганасана, по данным (Pagani et al., 2016)).

Для выявления гаплотипов из генотипов с неизвестной гаметной фазой применяли алгоритм ELB (Excoffier et al., 2003) пакета программ Arlequin 3.01. Достоверность различий в частотах гаплотипов в региональных выборках оценивали с помощью точного теста Фишера. Для получения медианных сетей гаплотипов гена *TRPM8* использовали программу Network 4.6 (www.fluxus-engineering.com).

Результаты и обсуждение

Анализ экзотов и прилегающих к ним интронных последовательностей гена *TRPM8* (суммарная длина примерно 80 т.п.н.) у 114 представителей коренного населения Сибири, секвенированных в настоящей работе и ранее (Clemente et al., 2014; Pagani et al., 2016), показал наличие 21 вариативной позиции. В большинстве случаев частота производных вариантов полиморфизма в выборке сибирского населения не превышала 10 %, и только в девяти позициях она составляла более 10 % (табл. 1).

Различные варианты наиболее частых у коренного населения Сибири полиморфных локусов (см. табл. 1) формируют 26 гаплотипов (табл. 2). Во всех региональных выборках обнаружено семь гаплотипов (гаплотипы 3, 9, 10, 12, 18, 23 и 26, см. табл. 2), распространенных с частотой от 2 до 28 %. Большинство гаплотипов относятся к числу уникальных, зарегистрированных только в одной из региональных выборок. Это гаплотипы 19, 20, 22 в Северо-Восточной Сибири, гаплотипы 1 и 14 в Центральной Сибири, гаплотипы 2, 7, 8, 15, 17 в Южной Сибири, гаплотипы 5 и 24 в Западной Сибири.

Примечательно, что гаплотип 19 – один из группы уникальных, распространен с довольно высокой частотой (14 %) в выборках из Северо-Восточной Сибири (у коряков и чукчей). Частота встречаемости другого распространенного на северо-востоке Сибири гаплотипа 25 (16 %) достоверно выше, чем в других региональных группах Сибири ($p = 0.04$ при сравнении с Центральной Сибирью, $p = 0.008$ при сравнении с Западной Сибирью, но $p = 0.05$ при сравнении с выборками из Южной Сибири).

Гаплотип 19 отличается от гаплотипа 12, характеризующегося предковыми вариантами полиморфизма для каждого из проанализированных локусов, по пяти позициям – по трем в интронах (rs10929319, rs28901644, rs10171428) и по двум в экзонах (rs7593557 и rs11563208). Гаплотип 25 отличается от гаплотипа 12 по четырем позициям – по двум в интронах (rs10929319 и rs12185590) и по двум в

Table 1. Polymorphic loci of the *TRPM8* gene in native Siberians with derived allele frequencies exceeding 10 %

SNP	Derived allele frequency, %	Nucleotide substitution	Locus position, amino acid substitution, and codon number
rs28901637	25.9	A→T	Exon, Pro249Pro
rs11562975	23.6	G→C	Exon, Leu250Leu
rs10929319	63.0	A→G	Intron
rs28901644	12.0	C→T	Intron
rs7593557	39.4	G→A	Exon, Ser419Asn
rs12185590	34.3	C→T	Intron
rs10171428	47.7	G→A	Intron
rs11563208	10.2	C→T	Exon, Ile1016Ile
rs11563071	19.0	C→G	Exon, Val1058Val

Table 2. Frequencies of haplotypes formed by SNPs rs28901637, rs11562975, rs10929319, rs28901644, rs7593557, rs12185590, rs10171428, rs11563208, and rs11563071 in Siberian populations according to data reported in Clemente et al. (2014) and Pagani et al. (2016)

No.	Haplotype	Northeastern Siberia (n = 25)	Central Siberia (n = 29)	Southern Siberia (n = 34)	West Siberia (n = 20)
1	ACGCGCACC	0	0.07	0	0
2	ACGCGCATC	0	0	0.04	0
3	ACGCGCGCC	0.14	0.03	0.10	0.125
4	ACGCGCGTC	0	0.03	0.06	0
5	ACGCGTACC	0	0	0	0.025
6	ACGCGTGCC	0.02	0.16	0.09	0
7	AGACACACG	0	0	0.01	0
8	AGACATAACC	0	0	0.01	0
9	AGACGCACC	0.12	0.21	0.09	0.15
10	AGACGCACG	0.10	0.03	0.06	0.10
11	AGACGCATC	0.04	0	0	0.025
12	AGACGCGCC	0.08	0.03	0.10	0.28
13	AGACGCGCG	0	0.02	0.01	0.05
14	AGACGCGTG	0	0.02	0	0
15	AGACGTGCC	0	0	0.04	0
16	AGGCATAACC	0	0.02	0.01	0
17	AGGCGCGCC	0	0	0.01	0
18	AGGTACACC	0.06	0.02	0.19	0.05
19	AGGTACATC	0.14	0	0	0
20	TGGCACACC	0.04	0	0	0
21	TGGCACGCC	0	0.02	0.01	0
22	TGGCACGTC	0.02	0	0	0
23	TGGCATAACC	0.02	0.12	0.06	0.075
24	TGGCATATC	0	0	0	0.025
25	TGGCATGCC	0.16	0.03	0.04	0
26	TGGCATGCG	0.06	0.21	0.03	0.10

No., haplotype number; n, sample size.

экзонах (rs28901637 и rs7593557). Как видно, гаплотипы 19 и 25 отличаются от гаплотипа 12 в позиции rs10929319 интрона и в позиции rs7593557 экзона. Мутация в последнем локусе приводит к аминокислотной замене Ser419Asn, остальные мутации в экзонных локусах гаплотипов 19

и 25 (rs11563208 и rs28901637 соответственно) к заменам аминокислот не приводят (см. табл. 1). Из указанных выше замен в экзонах функциональное значение, видимо, может иметь только синонимичная замена в локусе rs11563208, так как соответствующая этому локусу аминокислота

Table 3. Frequencies of genotypes and alleles (%) of rs11562975 and rs11563208 loci of the *TRPM8* gene in Siberian populations according to data reported in Clemente et al. (2014) and Pagani et al. (2016)

Loci/Populations	Genotypes			Alleles		Genotypes			Alleles	
	GG	GC	CC	G	C	CC	CT	TT	C	T
	rs11562975					rs11563208				
Northeastern Siberia (n = 28)	67.9 (19)	28.6 (8)	3.6 (1)	82.1 (46)	17.9 (10)	64.3 (18)	35.7 (10)	0	82.1 (46)	17.9 (10)
Central Siberia (n = 32)	46.9 (15)	43.8 (14)	9.4 (3)	68.8 (44)	31.2 (20)	90.6 (29)	9.4 (3)	0	95.3 (61)	4.7 (3)
Southern Siberia (n = 34)	52.9 (18)	35.3 (12)	11.8 (4)	70.6 (48)	29.4 (20)	79.4 (27)	20.6 (7)	0	89.7 (61)	10.3 (7)
West Siberia (n = 20)	75.0 (15)	20.0 (4)	5.0 (1)	85.0 (34)	15.0 (6)	90.0 (18)	10.0 (2)	0	95.0 (38)	5.0 (2)

n, sample size.

(изолейцин в позиции 1016 белка TRPM8) расположена в функционально важном TRP-доме этого белка. Вполне возможно, что синонимичная замена в локусе rs11563208 приводит к изменению уровня экспрессии гена *TRPM8*, тем самым влияя на процессы терморецепции.

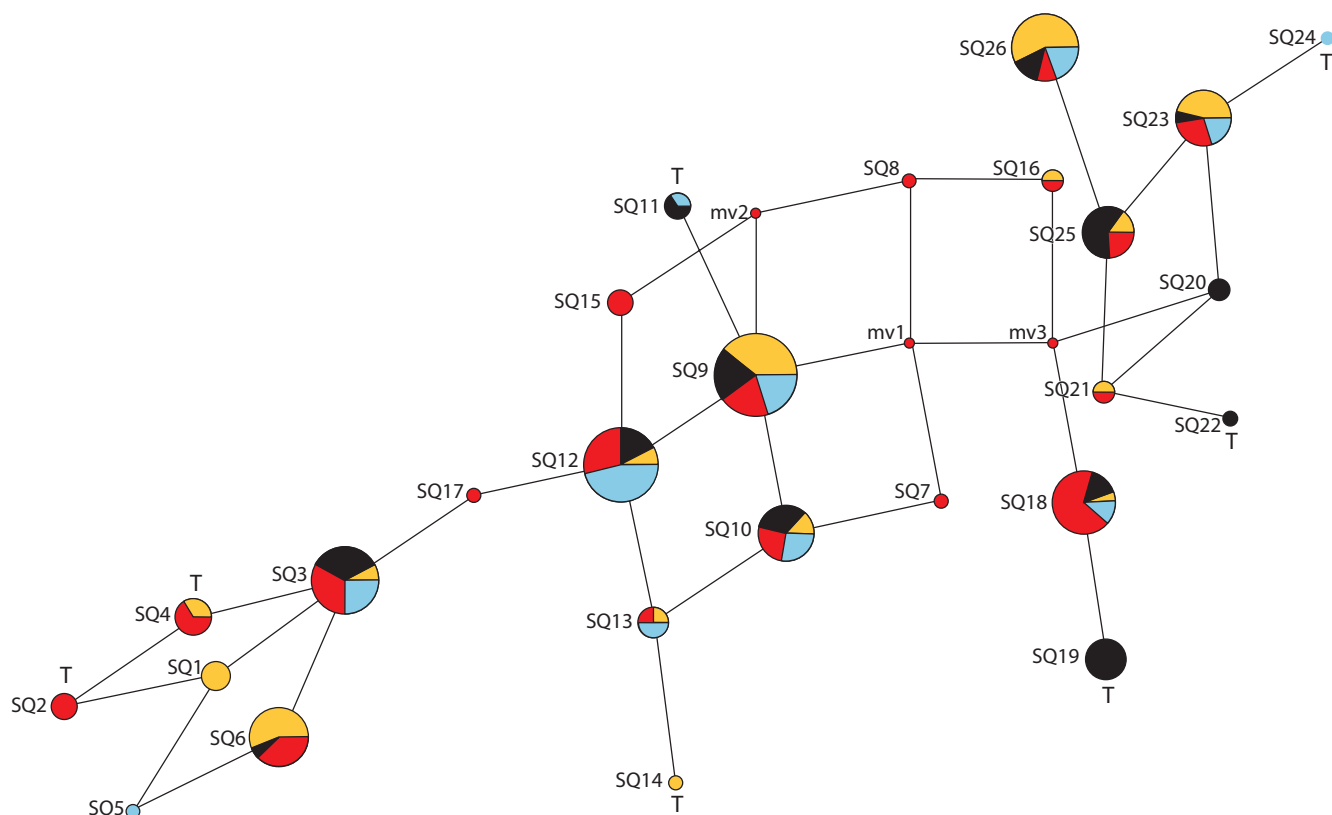
В ряде публикаций высказывалось предположение о том, что полиморфизм локуса rs11562975 связан с адаптацией к холоду. Так, было показано, что чукчи, проживающие в суровых условиях Крайнего Севера, отличаются от популяций Южной Сибири и Центральной Азии (тувинцы, казахи, шорцы, хакасы) по частоте аллелей локуса rs11562975 (Потапова и др., 2008). У жителей высокогорья в Киргизии частота производного (минорного) аллеля rs11562975 в полтора раза ниже ($p < 0.01$), чем у жителей низкогорья/среднегорья (Бабенко и др., 2015), что, по мнению авторов упомянутой работы, может быть связано с разной чувствительностью к холоду. Результаты физиолого-генетических исследований также свидетельствуют о взаимосвязи между полиморфизмом локуса rs11562975 и чувствительностью к холоду (Козырева и др., 2011, 2014). Между тем проведенное нами исследование показало, что частоты генотипов и аллелей этого локуса в региональных сибирских выборках достоверно не различаются (табл. 3). Возможно, что по мере увеличения размера выборок появятся и значимые различия по локусу rs11562975. Следует отметить, что по распределению гаплотипов, включающих в свой состав производный вариант С в локусе rs11562975 (первые шесть гаплотипов в табл. 2), также не наблюдается достоверных различий между выборками. Только частота гаплотипа 6 несколько повышена в Центральной Сибири, и там же обнаружен уникальный гаплотип 1.

Тем не менее, несмотря на малые объемы выборок, в распределении генотипов и аллелей локуса rs11563208 наблюдаются достоверные различия между группами из Северо-Восточной и Центральной Сибири ($p = 0.026$ для генотипов и $p = 0.036$ для аллелей) (см. табл. 3). В остальных сравнениях достоверных различий не выявлено, хотя частота производного аллеля Т на северо-востоке Сибири заметно выше, чем в других региональных выборках. В выборках коренного населения Северо-Восточной Сибири 70 % аллелей Т приходится на уникальный для этого региона гаплотип 19. Использование метода медианных сетей показало, что гаплотип 19, вероятнее всего, сформировался на базе гаплотипа 18, обнаруженного во всех

региональных выборках Сибири, но чаще (частота 19 %) на юге Сибири (см. рисунок). Кроме этого, в медианной сети гаплотипов видно, что аллель rs11563208-Т возникал на базе различных гаплотипов несколько раз.

Следует отметить, что по данным Проекта 1000 геномов (<http://www.ensembl.org>) частота встречаемости аллеля rs11563208-Т достигает высоких значений в различных региональных выборках населения мира. Так, в Латинской Америке (Колумбия, Мексика, Перу, Пуэрто-Рико) этот показатель составляет в среднем 32 %, в Восточной Азии (Китай, Япония, Вьетнам) – 8 %, в Европе – 25 %. Однако в латиноамериканских и европейских группах отсутствует аллель Т локуса rs28901644, в сочетании с которым находится вариант rs11563208-Т в гаплотипе 19, характерном для коренного населения Северо-Восточной Сибири. Между тем аллель rs28901644-Т присутствует с частотой 22 % в популяциях Восточной Азии, в связи с чем можно предполагать наличие гаплотипа 18 или родственных ему гаплотипов (включая гаплотип 19) у населения Восточной Азии. Для проверки этого предположения необходимы дополнительные исследования.

Таким образом, проведенное исследование показало, что в популяциях коренного населения Сибири наблюдается достаточно высокое разнообразие гаплотипов, сформированных комбинациями аллелей наиболее полиморфных локусов, которые расположены в экзонах и прилегающих интронных последовательностях гена *TRPM8*. Интересно, что в популяциях северо-востока Азии получил довольно большое распространение уникальный гаплотип, включающий замену в функционально важном участке, кодирующем TRP-домен холодового рецептора TRPM8. Этот рецептор представляет собой физиологический датчик холода (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002). Но одна лишь температура не может активировать TRPM8 во всех тканях, поскольку его экспрессия происходит в нервных окончаниях, иннервирующих висцеральные органы, такие как мочевой пузырь и нижний отдел желудочно-кишечного тракта, а также в ненейронных клетках простаты и мочевого пузыря (Tsavaler et al., 2001; Stein et al., 2004). Эти клетки не испытывают охлаждения до температуры, необходимой для активации TRPM8 (менее 25 °С). Поэтому активация холодовых рецепторов происходит с участием эндогенных модуляторов, таких как лизофосфолипиды и фосфатидилинозитол. Липидные модуляторы, таким образом, играют двойную роль – это настройка



Median graph of *TRPM8* haplotypes in Siberian populations.

Haplotypes found in natives of Northeastern Siberia are shown in black; in natives of Central Siberia, in yellow; Southern Siberia, red; West Siberia, light-blue. Haplotypes are designated with letters SQ and numerals as in Table 2. Median vectors are designated with red dots, letters mv, and numerals. Haplotypes with the T allele in rs11563208 are indicated with letter T. It is apparent that this allele arises independently in several haplotypes: SQ19, descending from SQ18; SQ22, descending from SQ21; SQ24, descending from SQ23; SQ11, descending from SQ29; SQ14, descending from SQ13; and SQ4 and SQ2, descending from SQ3.

температурной чувствительности холодовых рецепторов кожи и других тканей, контактирующих с внешней средой, и регуляция активности TRPM8-экспрессирующих нейронов, которыми иннервируются внутренние ткани и органы (Rohacs et al., 2005; Andersson et al., 2007). Полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) (арахидоновая, докозагексаеновая и эйкозапентаеновая) ингибируют рецепторы TRPM8, активируемые холодом, ицилином и ментолом (Andersson et al., 2007).

Как известно, в традиционной диете коренного населения северо-востока Азии (эскимосов, чукчей и коряков) издревле преобладали мясо и жир ластоногих и китов, богатый докозагексаеновой и эйкозапентаеновой жирными кислотами (Lapinski et al., 1995). Эти жирные кислоты должны оказывать ингибирующий эффект на холодовые каналы TRPM8, что в условиях Крайнего Севера, по всей видимости, не является эффективной стратегией. Возможно, появление гаплотипа 19, несущего аллель rs11563208-T, обусловлено необходимостью компенсировать негативное воздействие ПНЖК на термочувствительность каналов TRPM8. В таком случае полиморфизм локуса rs11563208 гена *TRPM8* (в дополнение к локусу rs80356779 гена *CPT1A* (Cardona et al., 2014; Clemente et al., 2014)) может служить еще одним примером того, как дисбаланс в питании первых жителей Арктики стал при-

чиной фиксации генных вариантов, которые позволили смягчить проявление метаболических издержек потребления жирной пищи.

Acknowledgments

This study was supported by RAS Presidium program "Pilot basic studies for the development of the Arctic belt of the Russian Federation". The authors acknowledge the help of Drs. T. Kivisild and F. Clemente, Cambridge University, UK.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Andersson D.A., Nash M., Bevan S. Modulation of the cold-activated channel TRPM8 by lysophospholipids and polyunsaturated fatty acids. *J. Neurosci.* 2007;27:3347-3355. DOI 10.1523/JNEUROSCI.4846-06.2007.
- Babenko V.N., Isakova J.T., Talaibekova E.T., Asambaeva D.A., Kobzev V.F., Potapova T.A., Voevoda M.I., Aldashev A.A. Polymorphism in the *TRP8* gene in Kyrgyz population: putative association with highland adaptation. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2015;19(5):630-637. DOI 10.18699/VJ15.080. (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.,

- Villems 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(5):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., Antão 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., Villems 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.
- Kozyreva T.V., Tkachenko E.Ia., Potapova T.A., Voevoda M.I. Respiratory system response to cooling in subjects with single nucleotide polymorphism rs11562975 in the gene for thermosensitive *TRPM8* ion channel. *Fiziol. Cheloveka = Human Physiology*. 2014;40(2):94-98. (in Russian)
- Kozyreva T.V., Tkachenko E.Ia., Potapova T.A., Romashchenko A.G., Voevoda M.I. Single-nucleotide polymorphism rs11562975 of the thermosensitive ion channel *TRPM8* gene and human sensitivity to cold and menthol. *Fiziol. Cheloveka = Human Physiology*. 2011;37(2):71-76. (in Russian)
- Kozyreva T.V., Voronova I.P. Involvement of neurogenomic regulation in the maintenance of temperature homeostasis in the cold. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2014;18(4/3):1100-1109. (in Russian)
- Lapinski A.G., Malyarchuk B.A., Solovenchuk L.L. Sea mammals triglycerides as an alternative source of omega-3 fatty acids for human consumption. *PICES Workshop on the Okhotsk Sea and Adjacent Areas*. Vladivostok, 1995;56.
- Latorre R., Brauchi S., Madrid R., Orio P. A cool channel in cold transduction. *Physiology*. 2011;26:273-285. DOI 10.1152/physiol.00004.2011.
- McKemy D.D., Neuhauser W.M., Julius D. Identification of a cold receptor reveals general role for TRP channels in thermosensation. *Nature*. 2002;416:52-58. DOI 10.1038/nature719.
- Naumov D.E., Perelman J.M., Kolosov V.P., Maksimov V.N., Voevoda M.I., Kolosov A.V., Zhou X.D., Li Q. Genetic polymorphism of thermosensitive cation channels *TRPM8* as a factor predisposing to cold airway hyperresponsiveness in patients with chronic obstructive lung diseases. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2012;45:8-14. (in Russian)
- Pagani L., Lawson D.J., Jagoda E., Mörseburg A., Eriksson A., Mitt M., Clemente F., Hudjashov G., DeGiorgio M., Saag L., Wall J.D., Cardona A., Mägi R., Sayres M.A.W., Kaewert S., Inchley C., Scheib C.L., Järve M., Karmin M., Jacobs G.S., Antao T., Iliescu F.M., Kushniarevich A., Ayub Q., Tyler-Smith C., Xue Y., Yunusbayev B., Tambets K., Mallick C.B., Saag L., Pocheshkhova E., Andriadze G., Muller C., Westaway M.C., Lambert D.M., Zoraqi G., Turdikulova S., Dalimova D., Sabitov Z., Sultana G.N.N., Lachance J., Tishkoff S., Momynaliev K., Isakova J., Damba L.D., Gubina M., Nymadawa P., Evseeva I., Atramentova L., Utevska O., Ricaut F.-X., Brucato N., Sudoyo H., Letellier T., Cox M.P., Barashkov N.A., Škaro V., Mulahasanovic' L., Primorac D., Sahakyan H., Mormina M., Eichstaedt C.A., Lichman D.V., Abdullah S., Chaubey G., Wee J.T.S., Mihailov E., Karunas A., Litvinov S., Khusainova R., Ekomasova N., Akhmetova V., Khidiyatova I., Marjanović D., Yepiskoposyan L., Behar D.M., Balanovska E., Metspalu A., Derenko M., Malyarchuk B., Voevoda M., Fedorova S.A., Osipova L.P., Lahr M.M., Gerbault P., Leavesley M., Migliano A.B., Petraglia M., Balanovsky O., Khusnutdinova E.K., Metspalu E., Thomas M.G., Manica A., Nielsen R., Villems R., Willerslev E., Kivisild T., Metspalu M. Genomic analyses inform on migration events during the peopling of Eurasia. *Nature*. 2016;538:238-242. DOI 10.1038/nature19792.
- Peier A.M., Moqrich A., Hergarden A.C., Reeve A.J., Andersson D.A., Story G.M., Earley T.J., Dragoni I., McIntyre P., Bevan S., Patapoutian A. ATRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell*. 2002;108:705-715.
- Potapova T.A., Yudin N.S., Babenko V.N., Pilipenko I.V., Kobsev V.F., Grigol'kau L.A., Voevoda M.I. Polymorphism for the cold receptor gene *TRPM8* in ethnic groups of Siberia and the Far East. *Inform. Vestnik VOGIS = The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeding Scientists*. 2008;12(4):749-754. (in Russian)
- Ramsey S., Delling M., Clapham D.E. An introduction to TRP channels. *Annu. Rev. Physiol.* 2006;68:619-647.
- Rohacs T., Lopes C.M., Michailidis I., Logothetis D.E. PI(4,5)P(2) regulates the activation and desensitization of *TRPM8* channels through the TRP domain. *Nat. Neurosci.* 2005;8:626-634. DOI 10.1038/nn1451.
- Stein R.J., Santos S., Nagatomi J., Hayashi Y., Minnery B.S., Xavier M., Patel A.S., Nelson J.B., Futrell W.J., Yoshimura N., Chancellor M.B., De Miguel F. Cool (*TRPM8*) and hot (*TRPV1*) receptors in the bladder and male genital tract. *J. Urology*. 2004;172(3):1175-1178. DOI 10.1097/01.ju.0000134880.55119.cf.
- Tsavalier L., Shapero M.H., Morkowski S., Laus R. *Trp-p8*, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins. *Cancer Res.* 2001;61(9):3760-3769.
- Voets T., Droogmans G., Wissenbach U., Janssens A., Flockerzi V., Nilius B. The principle of temperature-dependent gating in cold- and heatsensitive TRP channels. *Nature*. 2004;430:748-754. DOI 10.1038/nature02732.

Некоторые аспекты ассоциации генов с высокими спортивными достижениями

И.Б. Моссе¹✉, А.В. Кильчевский¹, Л.А. Кундас¹, А.А. Гончар¹, С.Л. Минин², К.В. Жур¹

¹ Государственное научное учреждение «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси», Минск, Республика Беларусь

² Государственное учреждение «Городской центр олимпийского резерва по ледовым дисциплинам», Минск, Республика Беларусь

Большинство работ по генетике спорта направлено на выявление различий между генотипами спортсменов и контрольной группы. Очевидно, генетические различия должны быть и среди спортсменов разной квалификации, поскольку чем больше благоприятных для спорта аллелей содержится в генотипе атлета, тем более высоких результатов он может достичь. Кроме того, спортивная одаренность зависит не только от наличия тех или иных полиморфных вариантов генов, но и от уровня их экспрессии, которая меняется в процессе тренировок у разных людей по-разному. Цель исследования – сравнить генотипы атлетов разной спортивной квалификации и проанализировать изменение активности генов, обеспечивающих адаптацию спортсменов к физическим нагрузкам. Методом ПЦР проанализированы генотипы 143 представителей 18 национальных команд Беларуси по разным видам спорта. Сравнение генотипов спортсменов разной квалификации (мастеров спорта, мастеров спорта международного класса, заслуженных мастеров спорта) показало, что чем выше квалификация спортсменов, тем чаще встречаются в их генотипах благоприятные для спорта аллельные варианты, что доказывает необходимость соответствующего генетического потенциала для достижения высоких спортивных результатов. У 15 высококвалифицированных спортсменов-конькобежцев проведен анализ экспрессии генов *UCP2*, *HIF1A* и *MTHFR* в ответ на двухнедельную гипоксическую тренировку. Выявлено статистически значимое увеличение среднего группового уровня мРНК генов *UCP2* и *MTHFR* в ответ на гипоксию, в то время как экспрессия гена *HIF1A* статистически значимо снизилась. При этом индивидуальные уровни экспрессии генов *UCP2*, *HIF1A* и *MTHFR* как на начальном этапе гипоксической тренировки, так и по ее окончании у спортсменов существенно различались. На примере гена *UCP2* показано влияние полиморфизма на экспрессию гена: для носителей генотипа Val/Val гена *UCP2* установлена более высокая активность гена по сравнению с носителями генотипов Val/Ala и Ala/Ala. Следовательно, генотипирование и анализ экспрессии генов имеют большое значение для отбора и подготовки спортсменов.

Ключевые слова: спортивная успешность; ПЦР-анализ; ДНК-полиморфизмы; программы отбора; экспрессия генов.

Some aspects of gene association with high sport achievements

I.B. Mosse¹✉, A.V. Kilchevsky¹, L.A. Kundas¹, A.L. Gonchar¹, S.L. Minin², K.V. Zhur¹

¹ Institute of Genetics and Cytology of NAS of Belarus, Minsk, Belarus

² Minsk City Olympic Reserve Skating Center, Belarus

Most papers on sport genetics identify differences between genotypes of athletes and a control group. It is obvious that the genetic differences should also be among sportsmen with different qualifications. Additionally, athletes' performance depends not only on their genotypes, but also on the gene activities, which can be different during the training process in various athletes. The aim of the study was to compare genotypes of athletes with different qualifications and to analyze the change in expression of some genes responsible for the physical performance. Genotypes of 143 elite sportsmen of 18 national teams were analyzed by PCR method. A comparison of the genotypes of Masters of Sports, International Masters of Sports and Honored Masters of Sports showed that the frequencies of favorable gene variants were higher in the genotypes of more qualified athletes; it proves an appropriate genetic potential necessity for high achievements in sports. The analysis of *UCP2*, *HIF1A* and *MTHFR* gene expression changes in response to two-week hypoxic training was performed on 15 skaters of high qualification. We found that average *UCP2* and *MTHFR* mRNA levels had significantly increased after the training but the expression of the *HIF1A* gene had reduced. At the same time, individual athlete variability in *UCP2*, *HIF1A* and *MTHFR* gene expression was revealed. Genotype influence on gene expression was shown with the help of the *UCP2* gene – its activity was higher in sportsmen with Val/Val than with Val/Ala or Ala/Ala genotypes. Consequently, genotyping and analysis of gene expression is very important for athlete selection and training.

Key words: athletic performance; PCR analysis; DNA polymorphisms; selection programs; gene expression.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Моссе И.Б., Кильчевский А.В., Кундас Л.А., Гончар А.Л., Минин С.Л., Жур К.В. Некоторые аспекты ассоциации генов с высокими спортивными достижениями. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(3):296-303. DOI 10.18699/VJ17.247

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Mosse I.B., Kilchevsky A.V., Kundas L.A., Gonchar A.L., Minin S.L., Zhur K.V. Some aspects of gene association with high sport achievements. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(3):296-303. DOI 10.18699/VJ17.247

Во всем мире активно ведутся исследования, направленные на выявление информативных молекулярно-генетических маркеров, позволяющих улучшить отбор перспективных спортсменов, а также повысить работоспособность атлетов и их результативность.

В разработанную нами ранее систему генетического тестирования в спорте (Моссэ и др., 2013) были включены гены, альтернативные варианты которых ассоциированы с выносливостью либо со скоростно-силовыми способностями: гены сердечно-сосудистой системы (гены роста эндотелия кровеносных сосудов, системы транспорта кислорода, генетические факторы тромбообразования), гены, ответственные за прочность костей и соединительной ткани, гены углеводно-жирового обмена и гены психоэмоционального состояния человека. Тестирование спортсменов по названным генам позволяет решить две задачи: определить благоприятные аллели, дающие преимущества в разных спортивных специализациях, и выявить неблагоприятные варианты генов у спортсменов для возможной корректировки их эффектов.

Проведено молекулярно-генетическое тестирование 450 высококвалифицированных спортсменов, представителей 25 олимпийских и национальных команд разных видов спорта, с целью выявления наиболее информативных маркеров, определяющих спортивную одаренность, поскольку именно эти спортсмены являются потенциальными носителями генотипов, благоприятных для соответствующих видов спорта. На основании выявленных различий в частотах благоприятных вариантов генов у спортсменов разных специализаций (Моссэ и др., 2010, 2012а, б; Кухтинская и др., 2012; Жур и др., 2013; Кундас и др., 2013) была разработана программа отбора начинающих спортсменов по четырем спортивным направлениям: скоростно-силовому, требующему выносливости, игровому и сложно-координационному (Моссэ и др., 2013).

Интересным представлялось сравнить генотипы атлетов разной спортивной квалификации, так как вполне логично предположить, что чем более высокие результаты показывает спортсмен, тем больше благоприятных для занятия спортом аллелей должен содержать его генотип. Кроме того, известно, что результативность атлетов зависит не только от наличия тех или иных вариантов генов, но и от активности работы этих генов, которая меняется в процессе тренировок у разных людей по-разному (Steph et al., 2009). Анализ экспрессии генов спортивной успешности – одно из наиболее актуальных направлений генетики спорта.

Таким образом, цель нашего исследования заключалась в сравнении генотипов атлетов разной спортивной квалификации и анализе изменений активности генов, обеспечивающих адаптацию к интенсивным физическим нагрузкам.

Материалы и методы

Проведение молекулярно-генетического тестирования спортсменов одобрено комитетом по этике государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр спорта» (Минск).

Протестированы образцы крови 143 высококвалифицированных спортсменов, в том числе 74 мастеров спор-

та (МС), 59 мастеров спорта международного класса (МСМК) и 10 заслуженных мастеров спорта (ЗМС). Спортсмены входили в состав 18 олимпийских и национальных команд Беларуси, проходивших медицинское обследование на базе Республиканского научно-практического центра спорта Министерства спорта и туризма Республики Беларусь. Среди обследованных спортсменов были представители циклических видов спорта (плавание, гребной слалом, академическая гребля, велоспорт, беговые виды легкой атлетики, конькобежный спорт), игровых видов спорта (хоккей с шайбой, баскетбол, теннис), скоростно-силовых (тяжелая атлетика, легкая атлетика (метание копья), стрельба из лука), сложнокоординационных (спортивная гимнастика, акробатика) и комбинированных видов спорта (современное пятиборье, биатлон).

В качестве биологического материала для исследования использовали ДНК и РНК, выделенные из лейкоцитов периферической крови с помощью наборов соответствующих реагентов для экстракции («Синтол», Россия). Генотипирование проведено по 11 генным полиморфизмам 10 генов.

Тестирование полиморфизмов генов *VEGF* –634G/C (rs2010963), *HIF1A* C1772T (rs11549465), *MTHFR* C677T и A1298C (rs1801133, rs1801131), *UCP2* Ala55Val (rs660339), *AMPD* C34T (rs17602729) выполняли методом ПЦР в реальном времени с использованием праймеров и зондов собственного дизайна. Последовательности праймеров и зондов, а также температурные режимы реакций амплификации приведены в таблице. Реакцию проводили в конечном объеме 10 мкл в следующих условиях: 5 мкл 2х супермикса для ПЦР iTaq Universal probes supermix (Bio-Rad, США), по 300 нМ прямого и обратного праймера, по 50 нМ каждого зонда и 15 нг исследуемой ДНК.

Генетическое тестирование полиморфизмов генов *MB* A79G (rs7293) и *PPARG* Pro12Ala (rs1801282) осуществляли с использованием наборов праймеров и зондов компании Applied Biosystems (C_2506456_1, C_1129864_10 соответственно) согласно инструкции производителя. Генотипирование полиморфизмов генов *ACE* Alu Ins/Del (rs4646994), *BDKRB2* I/D (rs5810761), *ACTN3* R577X (rs1815739) проводили с применением описанных в литературе методик (Rigat et al., 1992; Wang et al., 2010; Zempo et al., 2011).

У 15 высококвалифицированных спортсменов национальной команды Республики Беларусь по конькобежному спорту была проанализирована экспрессия генов *UCP2*, *HIF1A* и *MTHFR* в ответ на двухнедельную гипоксическую тренировку (на велотренажере), которая применяется в профессиональном спорте для повышения выносливости. Спортсмены тренировались в условиях гипоксии (моделируемая высота – до 3200 м) ежедневно по два часа на протяжении 14 дней по схеме, указанной в методических рекомендациях, с постоянным контролем насыщенности крови кислородом. Основные параметры горного климата создавали и поддерживали с помощью установки Low Oxygen Systems (Германия).

Относительный количественный анализ экспрессии генов проводили методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией с ген-специфичными праймерами TaqMan Gene Expression Assays (Hs00153153_m1,

PCR primers, probes, and temperature schedules for genotyping polymorphisms
in the genes *VEGF*, *HIF1A*, *MTHFR*, *UCP2*, and *AMPD*

Gene/polymorphism	Designation	Sequences of primers and probes (5'→3')	Temperature schedule
<i>VEGF</i> -634G/C (rs2010963)	VEGF_F	agcagaaagaggaaagaggttagc	95° – 10 min
	VEGF_R	caaaagcaggtcactcactttg	95° – 20 sec
	VEGF_C	[FAM]ccctgtcgctttcgctgctc[BHQ1]	65° – 30 sec
	VEGF_G	[ROX]ccctgtccctttcgctgctc[BHQ2]	40 cycles
<i>HIF1A</i> C1772T (rs11549465)	HifR	tttcagggttcgcggaac	95° – 10 min
	HifF	tggagatgtagctccctatatcc	95° – 20 sec
	HifC	[FAM]tcgatcagttgtcaccattagaagcagt[BHQ1]	65° – 30 sec
	HifT	[ROX]tcgatcagttgtcatcattagaagcagt[BHQ2]	40 cycles
<i>MTHFR</i> C677T (rs1801133)	677F	tgacctgaagcactgaaggagaa	95° – 5 min
	677R	ggaagaatgtgtcagcctcaaaga	95° – 10 sec
	677C	[FAM]atgaaatcggtcccg[BHQ1]	57° – 20 sec
	677T	[ROX]atgaaatcggtcccg[BHQ2]	40 cycles
<i>MTHFR</i> A1298C (rs1801131) (multiplex)	1298F	ggaggagctgctgaagatgtg	
	1298R	tctcccagaggttaagaacaaa	
	1298A	[Cy5]aaagacattttctcactg[BHQ2]	
	1298C	[6TET-AH]agacacttgcttctcactg[BHQ1]	
<i>UCP2</i> Ala55Val (rs660339)	UCP2-F	ttgcagatccaaggagaaagtca-3'	95° – 5 min
	UCP2-R	ccctcagtagcaccatggt-3'	95° – 15 sec
	UCP2-1	[FAM]cgctacagccagcgccagtacc[BHQ1]	64° – 60 sec
	UCP2-2	[ROX]cgctacagtcagcgccagtaccg[BHQ2]	40 cycles
<i>AMPD</i> C34T (rs17602729)	AMPDF	agccaccatgattacaga	95° – 10 min
	AMPD-R	ctgacaaatggcagcaaa	95° – 20 sec
	AMPDW	[FAM]tgcaatactcagctttctcttcagc[BHQ1]	61° – 30 sec
	AMPDM	[ROX]tgcaatactcacatttctcttcagct[BHQ2]	40 cycles

Hs01075227_m1, Hs00195560_m1 (Applied Biosystems)) в соответствии с инструкцией производителя. Синтез кДНК выполняли с помощью набора Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific). Уровень экспрессии изучаемых генов нормализовали относительно экспрессии гена «домашнего хозяйства» *GAPDH* (Hs03929097_g1, Applied Biosystems), в связи с чем этот показатель представлен в условных единицах.

Для детекции флуоресценции, а также первичной обработки результатов применяли программное обеспечение CFX96 Manager 3.1 (прибор CFX96, Bio-Rad, США) в автоматическом режиме.

Статистическую обработку данных проводили в пакете программ Statistica 10.0, за исключением анализа зависимости двух категориальных параметров – спортивной квалификации и генотипов атлетов, который выполнен с использованием функции Fisher.test пакета Stat программы RStudio (для таблиц размерности $n \times m$ (Agresti, 2002)). Сравнение среднегрупповых значений экспрессии производили с помощью критерия Манна–Уитни. Для проверки различий между двумя выборками парных из-

мерений уровней экспрессии применяли Т-критерий Вилкоксона. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0.05$.

Результаты и обсуждение

Сравнение генотипов атлетов разной квалификации

Проведен анализ распределения аллельных вариантов 9 генов, ассоциированных со спортивной успешностью, в генотипах атлетов с различной спортивной квалификацией.

При разделении спортсменов на группы в зависимости от специализации, выборка атлетов самой высокой квалификации (ЗМС) оказалась слишком мала для обнаружения статистически значимых различий в частотах встречаемости аллельных вариантов исследуемых генов. При сравнении генотипов всех высококвалифицированных спортсменов без учета специализации выявлено следующее распределение частот аллельных вариантов ряда генных полиморфизмов, очевидно, благоприятных

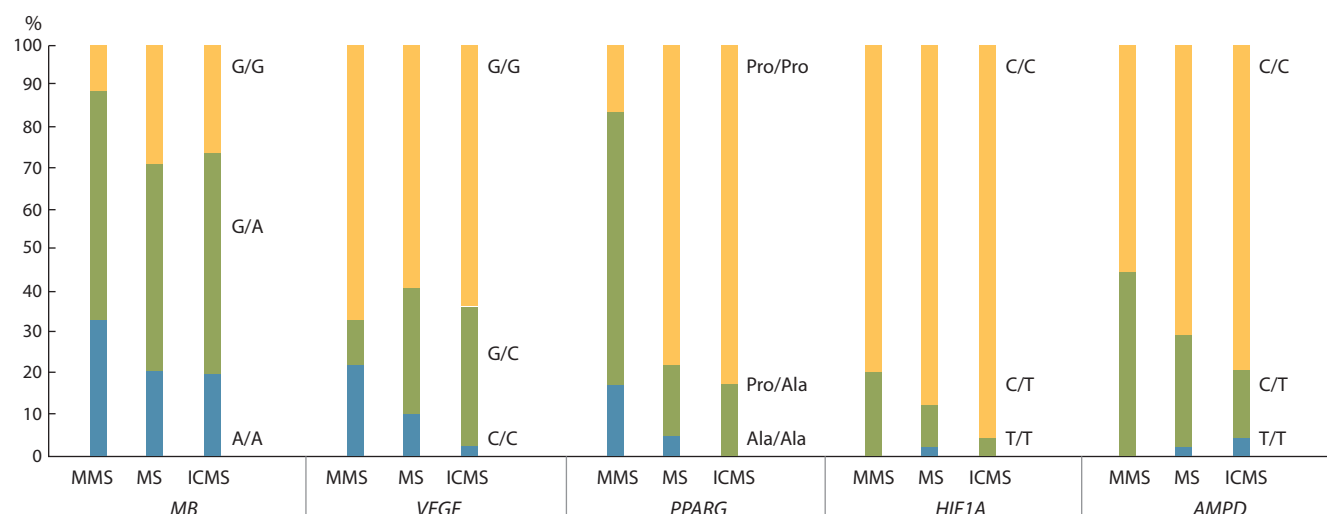


Fig. 1. Allele frequencies of the *MB*, *VEGF*, *PPARG*, *HIF1A*, and *AMPD* genes in groups of athletes of different ranks.

для разных специализаций: C/T+T/T гена *HIF1A* (MC – 4.1 %, MСМК – 11.9 %, ЗМС – 20.0 %), C/C гена *VEGF* (MC – 2.7 %, MСМК – 10.2 %, ЗМС – 22.2 %) и Ala/Ala гена *PPARG* (MC – 0 %, MСМК – 4.5 %, ЗМС – 16.7 %) (рис. 1).

Для полиморфного варианта Pro12Ala гена *PPARG* выявлена зависимость частоты встречаемости случая Ala/Ala от квалификации спортсменов ($\chi^2 = 16.74$; $p < 0.05$): чем выше квалификация атлетов, тем чаще в их генотипах встречается данный вариант гена.

Для полиморфизмов C1772T *HIF1A* и –634G/C *VEGF* статистически значимых различий в распределении частот генотипов обнаружено не было, что, вероятно, обусловлено недостаточным размером выборки спортсменов с наиболее высокой квалификацией (ЗМС). Однако при объединении ЗМС и MСМК в одну группу выявлены значимые различия в распределении полиморфных вариантов C1772T гена *HIF1A* и –634G/C гена *VEGF*: установлено, что в группе спортсменов MСМК+ЗМС носители генотипов C/C гена *VEGF* и CT+TT гена *HIF1A* встречаются значительно чаще ($p < 0.05$), чем в группе MC.

Полученные результаты можно объяснить важной ролью этих генных вариантов для спортивной успешности. Так, наличие аллеля T гена *HIF1A* повышает транскрипционную активность гена и стабильность белка HIF1a, благодаря чему увеличивается устойчивость клеток к гипоксии; аллель C гена *VEGF* ассоциирован с повышенной активностью гена, большим приростом кровеносных сосудов, что увеличивает максимальное потребление кислорода в ответ на аэробные нагрузки; аллельный вариант Ala/Ala гена *PPARG* обеспечивает повышенную чувствительность тканей к инсулину, что способствует большему приросту мышечной силы в ответ на физические нагрузки (Ахметов, 2009).

Нами также отмечено, что в группах более квалифицированных спортсменов частота встречаемости благоприятного аллельного варианта I/I гена *ACE* выше (MC – 17.6 %, MСМК – 28.8 %, ЗМС – 33.3 %), а частоты встречаемости неблагоприятных вариантов T/T гена *AMPD* (MC – 4.1 %, MСМК – 1.7 %, ЗМС – 0 %) и X/X гена

ACTN3 (MC – 17.6 %, MСМК – 11.9 %, ЗМС – 0 %) ниже, чем у менее квалифицированных (рис. 1 и 2). Однако эти результаты оказались статистически незначимыми.

Повышенную частоту встречаемости аллельного варианта I/I гена *ACE* можно объяснить тем, что этот вариант обеспечивает высокую аэробную работоспособность спортсменов, поэтому чем выше квалификация спортсменов, тем чаще в их генотипах выявляется вариант I/I (Montgomery et al., 1998; Sgourou et al., 2012).

Низкая частота встречаемости варианта T/T гена *AMPD* у спортсменов высокой квалификации может быть обусловлена тем, что аллель T ассоциирован с синтезом укороченного белка с пониженной активностью аденозинмонофосфат-дезаминазы – фермента, регулирующего энергетические процессы в клетке, что снижает скорость восстановления спортсмена после выполнения высокоинтенсивных физических нагрузок (Ахметов, 2009).

Что касается низкой частоты встречаемости аллельного варианта X/X гена *ACTN3* в генотипах высококвалифицированных атлетов, то этот факт можно объяснить тем, что у носителей варианта R/R быстрые мышечные волокна способны под воздействием тренировок превращаться в медленные, т.е. носители варианта R/R могут усовершенствовать свои аэробные качества и повысить выносливость. В то же время носители генотипа X/X не могут изменить состав своих мышц, выполняя нагрузки скоростно-силового характера (Janssen, 2001). Поэтому наличие аллеля R более благоприятно не только для спортсменов скоростно-силовых видов спорта, но и для атлетов, тренирующих выносливость. Полученные нами данные согласуются с результатами других исследователей (Дружевская, 2006; Kikuchi et al., 2015), которые установили, что частота R аллеля гена *ACTN3* превалирует у спортсменов, занимающихся как скоростно-силовыми видами спорта, так и видами спорта, требующими выносливости.

Для полиморфных вариантов Ala55Val *UCP2*, I/D *BDKRB2*, A79G *MB* статистически значимых различий в распределении частот генотипов в зависимости от квали-

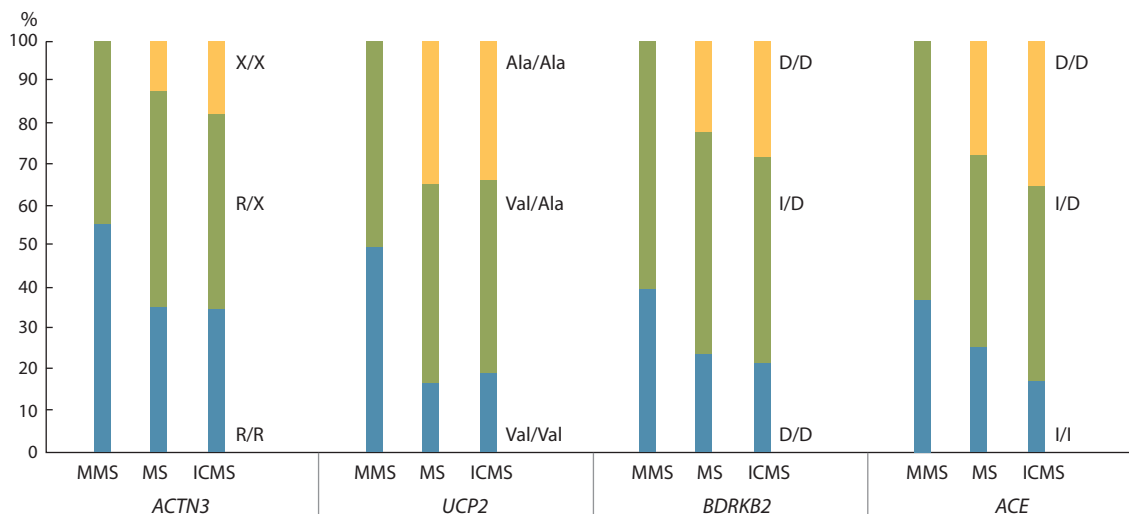


Fig. 2. Allele frequencies of the *ACTN3*, *UCP2*, *BDRKB2*, and *ACE* genes in groups of athletes of different ranks.

фикации спортсменов обнаружено не было, что, вероятно, обусловлено малым размером выборки спортсменов с наиболее высокой квалификацией (ЗМС). Заслуженные мастера спорта – это выдающиеся спортсмены, чемпионы, самая малочисленная группа среди протестированных спортсменов. Тем не менее, как видно из рис. 1 и 2, в группе ЗМС частота гомозигот по «благоприятным» аллелям значительно выше, чем в группах МС и МСМК, между которыми различий практически нет. Причем для гена *UCP2* различия вплотную приближаются к статистически значимым. Следовательно, и для этих генов можно говорить о наблюдаемой тенденции: чем выше квалификация атлетов, тем чаще в их генотипах встречаются благоприятные варианты генов.

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что для того, чтобы стать выдающимся спортсменом, необходимо обладать соответствующим генетическим потенциалом, в отсутствие которого любые усилия могут оказаться недостаточными.

Определение экспрессии ряда генов спортивной успешности

Для исследования были выбраны ассоциированные со спортивной успешностью и экспрессирующиеся в крови гены *UCP2*, *HIF1A* и *MTHFR*. Проведенный анализ изменения экспрессии этих генов у конькобежцев выявил статистически значимое увеличение среднегрупповых уровней мРНК гена *UCP2* с 0.39 ± 0.05 до 1.55 ± 0.09 усл. ед. ($p \leq 0.05$) и гена *MTHFR* с 0.20 ± 0.02 до 0.66 ± 0.05 усл. ед. ($p \leq 0.05$) в ответ на стимулирующее и адаптирующее действие двухнедельной гипоксической тренировки.

Ген *UCP2* – один из представителей семейства разобщающих белков. Он принимает участие в термогенезе, регуляции обмена жиров и расхода энергии, в защите от активных форм кислорода, а также влияет на секрецию инсулина и нейропротекцию. Препятствуя выработке инсулина клетками поджелудочной железы, продукт гена *UCP2* способствует липолизу – использованию жирных

кислот в качестве источника энергии, что увеличивает работоспособность и выносливость организма (Brand, Esteves, 2005). В ответ на тренировку аэробной направленности экспрессия гена в скелетных мышцах человека увеличивается, в свою очередь повышенная активность гена изменяет продукцию гликолитических и окислительных ферментов, в результате чего происходит сдвиг в сторону более экономного способа энергообеспечения – окислительного фосфорилирования (Buemann et al., 2001). Таким образом, увеличение экспрессии гена *UCP2* свидетельствует о переходе на более экономичный способ энергообеспечения.

Фермент метилентетрагидрофолатредуктаза, кодируемый геном *MTHFR*, катализирует восстановление 5,10-метилентетрагидрофолата в 5-метилтетрагидрофолат, который является активной формой фолиевой кислоты, необходимой для образования метионина из гомоцистеина и далее – S-аденозилметионина, играющего ключевую роль в процессе метилирования ДНК. Метилирование ДНК контролирует активность многочисленных генов, в том числе задействованных в процессе адаптации к физическим нагрузкам и к гипоксии, а также ответственных за рост мышечной ткани и синтез митохондрий (Barres, Zierath, 2011; Terruzzi et al., 2011). Следовательно, увеличение экспрессии гена *MTHFR* в ответ на интервальные гипоксические тренировки может свидетельствовать о запуске вышеперечисленных процессов для адаптации организма к гипоксии.

В то же время среднегрупповой уровень экспрессии гена *HIF1A* в ответ на гипоксию статистически значимо снизился с 3.04 ± 0.25 до 1.61 ± 0.13 усл. ед. ($p \leq 0.05$). Это можно объяснить тем, что продукт гена *HIF1A* служит ведущим транскрипционным регулятором генов, ответственных за реакцию на недостаток кислорода, обеспечивая быстрые и адекватные ответы на гипоксический стресс, активизирует гены, регулирующие процесс ангиогенеза, вазомоторный контроль, энергетический метаболизм и эритропоэз (Ameln et al., 2005; Lundby, Gassman,

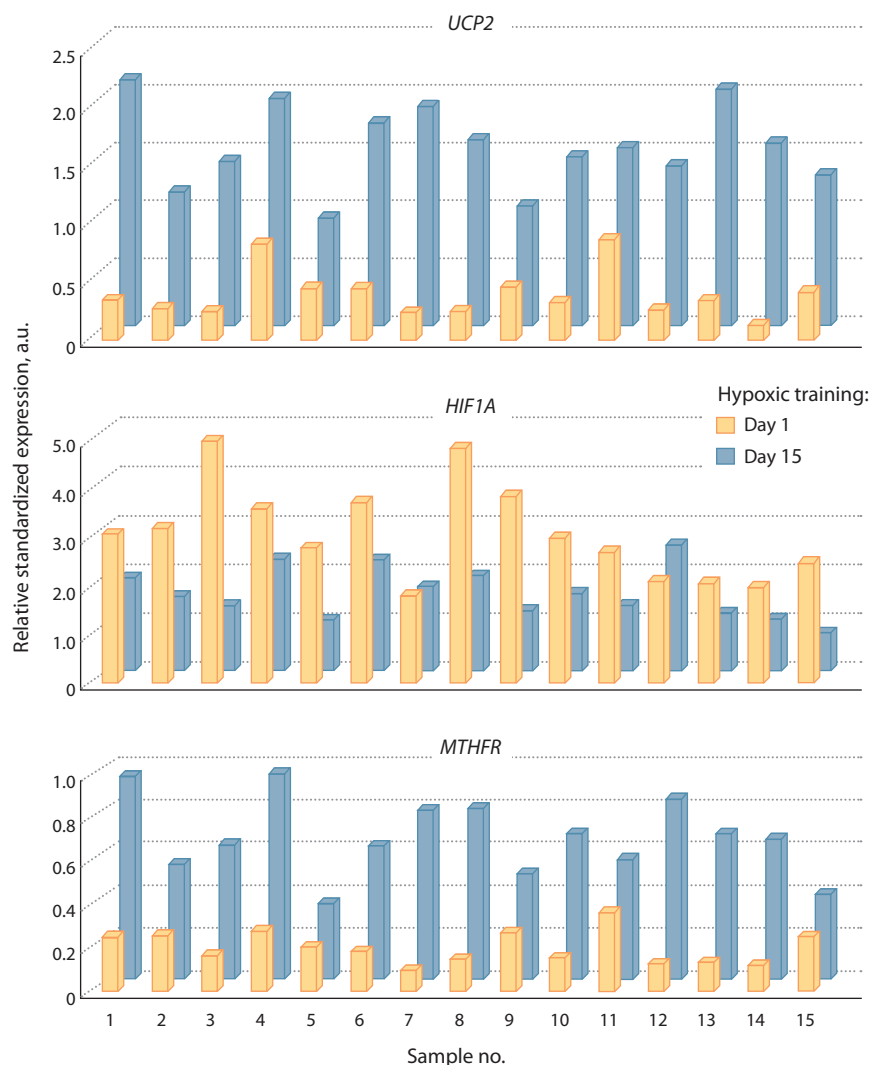


Fig. 3. Individual variations in levels of the *UCP2*, *HIF1A* and *MTHFR* RNAs in athletes in response to hypoxic training.

2006). Поэтому в ответ на гипоксию уровень экспрессии гена *HIF1A* быстро и резко возрастает для запуска комплекса генов, ответственных за адаптацию к недостатку кислорода (Döring et al., 2010), и в то время, когда активность данных генов увеличивается, экспрессия гена *HIF1A* уже снижается, поскольку ни одна биологическая система не может длительное время находиться в состоянии перенапряжения.

Необходимо отметить, что изменение активности гена у каждого спортсмена носит индивидуальный характер (рис. 3). Так, экспрессия гена *UCP2* под воздействием гипоксии увеличилась у атлета № 11 в 1.8 раза, а у спортсмена № 14 – более чем в 12 раз. Обращает на себя внимание также индивидуальный характер базового уровня экспрессии этого гена – у разных спортсменов он колеблется от 0.13 до 0.87 усл. ед. (см. рис. 3).

Индивидуальные различия в динамике активности были выявлены и при анализе экспрессии генов *HIF1A* и *MTHFR* как на базовом уровне, так и под воздействием гипоксии (см. рис. 3).

Таким образом, нагрузка одинаковой интенсивности изменяет экспрессию генов у разных спортсменов в разной степени и даже в различных направлениях. Полученные нами данные указывают на необходимость индивидуального подхода к составлению программы тренировок и фармакологического обеспечения.

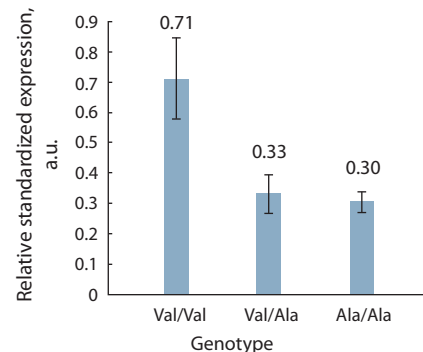


Fig. 4. *UCP2* gene expression level in athletes at the initial stage of hypoxic training depending on Ala55Val polymorphism variant.

В научной литературе практически отсутствует информация о том, как экспрессируются исследуемые нами гены в гетерозиготном состоянии, т. е. при наличии благоприятного и неблагоприятного полиморфных аллелей в одном генотипе. Работает ли один из аллелей или оба, обуславливая средний уровень синтеза соответствующего продукта. Поэтому представлялось интересным сравнить экспрессию гомо- и гетерозиготных аллельных вариантов генов.

Нами проанализирована взаимосвязь разных полиморфных вариантов Ala55Val гена *UCP2*, C1772T гена *HIF1A*, C677T и A1298C гена *MTHFR* с уровнями их экспрессии. Установлены статистически значимые различия в активности работы гена *UCP2* – под воздействием гипоксии у вариантов Val/Ala и Ala/Ala экспрессия гена ниже, чем у гомозиготы Val/Val (0.33 ± 0.06 и 0.30 ± 0.03 соответственно против 0.71 ± 0.13 усл. ед.; $p \leq 0.05$) (рис. 4). Следовательно, для гомозиготы Val/Val гена *UCP2* характерна более высокая активность, что обуславливает повышенную способность использовать жирные кислоты в качестве источника энергии и, соответственно, увеличивает работоспособность и выносливость организма. Это подтверждает высокая частота встречаемости аллеля 55Val у представителей видов спорта, тренирующих выносливость (Buemann et al., 2001).

Судя по полученным данным, активность гетерозиготы Val/Ala гена *UCP2* практически не отличается от экспрессии гомозиготного варианта

Ala/Ala, что позволяет корректно оценивать вклад данного гетерозиготного варианта в потенциал спортсмена при интерпретации результатов генетического тестирования.

Для полиморфизмов C1772T гена *HIF1A*, C677T и A1298C гена *MTHFR* статистически значимых различий в экспрессии в зависимости от аллельного варианта не выявлено.

Таким образом, исследование уровней экспрессии генов спортивной успешности является важным этапом при подготовке профессиональных спортсменов, поскольку сведения об активности работы генов могут выступать в качестве дополнительного критерия, характеризующего адаптацию атлета к интенсивным физическим нагрузкам.

Заключение

Сравнение генотипов спортсменов разной квалификации (мастеров спорта, мастеров спорта международного класса, заслуженных мастеров спорта) показало, что чем выше квалификация спортсменов, тем чаще встречаются в их генотипах благоприятные для спорта аллельные варианты. Так, частоты генотипов C/T+T/T гена *HIF1A* и C/C гена *VEGF* в группе спортсменов с квалификациями МСМК+ЗМС достоверно выше, чем в группе спортсменов с квалификацией МС ($p \leq 0.05$). Подобная зависимость выявлена и для частоты встречаемости гомозиготы Ala/Ala гена *PPARG*. Следовательно, можно сделать вывод о том, что для достижения выдающихся результатов атлету необходимо обладать соответствующим генетическим потенциалом, в отсутствие которого все усилия могут оказаться безрезультатными.

Анализ экспрессии генов *UCP2*, *HIF1A* и *MTHFR* показал, что у спортсменов под воздействием гипоксических тренировок, направленных на повышение выносливости, происходит статистически значимое увеличение среднegrupповых уровней активности генов *UCP2* и *MTHFR* и снижение экспрессии гена *HIF1A*. При этом установлены индивидуальные различия в активности генов на различных этапах тренировки у разных спортсменов, что свидетельствует о необходимости индивидуального подхода к их подготовке.

На примере гена *UCP2* показаны статистически значимые различия уровней экспрессии гена у носителей разных аллельных вариантов полиморфизма Ala55Val: у обладателей гомозиготы Val/Val установлена более высокая экспрессия гена по сравнению с носителями аллельных вариантов Val/Ala и Ala/Ala. Полученные данные позволяют ответить на вопрос о том, как экспрессируются гены при наличии в гетерозиготе благоприятного и неблагоприятного полиморфных аллелей, что необходимо учитывать для корректной оценки вклада гетерозиготного варианта в спортивный потенциал спортсмена.

Таким образом, комплексный подход, включающий в себя как определение генотипов атлетов, так и анализ экспрессии генов, ответственных за адаптацию к интенсивным физическим нагрузкам, обеспечивает более эффективный отбор перспективных спортсменов и позволяет корректировать программу тренировок для каждого спортсмена индивидуально с целью сохранения его здоровья и повышения результативности.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Agresti A. Categorical Data Analysis. 2nd ed. N.Y.: Wiley, 2002;91-101.
- Ahmetov I.I. Molekulyarnaya genetika sporta [Molecular genetics of sport]. Moscow: Sovetskiy Sport, 2009. (in Russian)
- Ameln H., Gustafsson T., Sundberg J., Okamoto K., Jansson E., Poellinger L., Makino Y. Physiological activation of hypoxia inducible factor-1 in human skeletal muscle. *FASEB J.* 2005;19(8):1009-1011. DOI 10.1096/fj.04-2304fje.
- Barres R., Zierath J.R. DNA methylation in metabolic disorders. *Am. J. Clin. Nutr.* 2011;93(4):897-900. DOI 10.3945/ajcn.110.001933.
- Brand M.D., Esteves T.C. Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metab.* 2005;2(2):85-93. DOI 10.1016/j.cmet.2005.06.002.
- Buemann B., Schierner B., Toubro S., Bibby B.M., Sørensen T., Dalgaard L., Pedersen O., Astrup A. The association between the val/ala-55 polymorphism of the uncoupling protein 2 gene and exercise efficiency. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 2001;25(4):467-471.
- Döring F., Onur S., Fischer A., Boulay M.R., Pérusse L., Rankinen T., Rauramaa R., Wolfarth B., Bouchard C. A common haplotype and the Pro582Ser polymorphism of the hypoxia-inducible factor-1 α (*HIF1A*) gene in elite endurance athletes. *J. Appl. Physiol.* 2010;108(6):1497-1500. DOI 10.1152/japplphysiol.01165.2009.
- Druzhevskaya A.M. Polimorfizm gena *ACTN3* u sportsmenov [R577X polymorphism of the *ACTN3* gene in athletes]. *Geneticheskie, psikhofizicheskie i pedagogicheskie tekhnologii podgotovki sportsmenov* [Genetic, Psychophysical and Pedagogical Technologies of Athlete Training]. Petersburg, 2006;58-67. (in Russian)
- Janssen P. Lactate Threshold Training. L.: Human Kinetics, 2001.
- Kikuchi N., Miyamoto-Mikami E., Murakami H., Nakamura T., Min S.K., Mizuno M., Naito H., Miyachi M., Nakazato K., Fuku N. *ACTN3* R577X genotype and athletic performance in a large cohort of Japanese athletes. *Eur. J. Sport. Sci.* 2015;16(6):694-701. DOI 10.1080/17461391.2015.1071879.
- Kukhtinskaya L.V., Zhur K.V., Kundas L.A. Molecular genetic analysis of genetic markers of adaptation to hypoxia in highly qualified athletes. *Prilozhenie k zhurnaly "Vesti Natsyonalnay akademii nauk Belarusi"* = Supplement to Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. 2012;3:102-105. (in Russian)
- Kundas L.A., Zhur K.V., Byshnev N.I., Prohorova T.N., Lositskiy Y.A., Mosse I.B. Analysis of genetic markers for resistance to a physical stress in elite collegiate rowers. *Molekular. i prikl. genetika = Mol. Appl. Genetics.* 2013;14:101-106. (in Russian)
- Lundby C., Gassmann M., Pilegaard H. Regular endurance training reduces the exercise induced HIF-1 α and HIF-2 α mRNA expression in human skeletal muscle in normoxic conditions. *Eur. J. Appl. Physiol.* 2006;96(4):363-369. DOI 10.1007/s00421-005-0085-5.
- Montgomery H.E., Marshall R., Hemingway H., Myerson S., Clarkson P., Dollery C., Hayward M., Holliman D.E., Jubb M., World M., Thomas E.L., Brynes A.E., Saeed N., Barnard M., Bell J.D., Prasad K., Rayson M., Talmud P.J., Humphries S.E. Human gene for physical performance. *Nature.* 1998;393:221-222. DOI 10.1038/30374.
- Mosse I.B., Gonchar A.L., Kukhtinskaya L.V., Mosse N.I., Malashevich P.N., Semenyakov A.V. Genetic markers of organism resistance to hypoxia. *Molekular. i prikl. genetika = Mol. Appl. Genetics.* 2010;11:74-82. (in Russian)
- Mosse I.B., Gonchar A.L., Zhur K.V., Kundas L.A., Byshnev N.I. Molecular genetic analysis of predisposition to various sports. *Dosyagnennya i problemi genetiki, seleksii ta biotekhnologii = Achievements and Problems of Genetics, Breeding, and Biotechnology.* 2012a;3:332-337. (in Russian)
- Mosse I.B., Gonchar A.L., Zhur K.V., Kundas L.A., Byshnev N.I., Malashevich P.N., Lositskiy E.A., Pozdnjak N.V. A system of genetic

- testing of athletes for resistance to hypoxia. *Konsilium = Consilium*. 2013;3:17-18. (in Russian)
- Mosse I.B., Gonchar A.L., Zhur K.V., Mosse N.I., Kundas L.A., Byshnev N.I., Malashevich P.N., Semenyakov A.V. A genotype comparison of different specialization sportsmen by sport gene complex. *Molekular. i prikl. genetika = Mol. Appl. Genetics*. 2012b;13:19-24. (in Russian)
- Rigat B., Hubert C., Corvol P., Soubrier F. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl carboxypeptidase 1). *Nucl. Acids Res*. 1992;20(6):1433.
- Sgourou A., Fotopoulos V., Kontos V., Patrinos G.P., Papachatzopoulou A. Association of genome variations in the reninangiotensin system with physical performance. *Human Genomics*. 2012;6:24. DOI 10.1186/1479-7364-6-24.
- Stepito N.K., Coffey V.G., Carey A.L., Ponnampalam A.P., Canny B.J., Powell D., Hawley J. A. Global gene expression in skeletal muscle from well-trained strength and endurance athletes. *Med. Sci. Sports Exerc*. 2009;41:546-565. DOI 10.1249/mss.0b013e31818c6be9.
- Terruzzi I., Senesi P., Montesano A., Luzi L. Genetic polymorphisms of the enzymes involved in DNA methylation and synthesis in elite athletes. *Physiol. Genomics*. 2011;43(16):965-973. DOI 10.1152/physiolgenomics.00040.2010.
- Wang P., Koehle M.S., Rupert J.L. No association between alleles of the bradykinin receptor-B2 gene and acute mountain sickness. *Exp. Biol. Med*. 2010;235(6):737-740. DOI 10.1258/ebm.2010.009325.
- Zempo H., Tanabe K., Murakami H., Iemitsu M., Maeda S., Kuno S. Age differences in the relation between *ACTN3* R577X polymorphism and thigh-muscle cross-sectional area in women. *Genet. Testing Mol. Biomarkers*. 2011;15(9):639-643. DOI 10.1089/gtmb. 2011.0005.
- Zhur K.V., Kundas L.A., Byshnev N.I., Lositskiy Y.A., Malashevich P.N., Mosse I.B. Molecular genetic analysis of *HIF1A* gene to test athlete performance. *Molekular. i prikl. genetika = Mol. Appl. Genetics*. 2013;13:19-24. (in Russian)

Эффективность ольфакторного транспорта наночастиц оксида марганца (II) при однократном или многократном интраназальном введении

А.В. Ромащенко^{1, 2}✉, М.Б. Шарапова¹, Д.В. Петровский¹, М.П. Мошкин¹

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 Конструкторско-технологический институт вычислительной техники Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

В экспериментах с многократным ингаляционным введением наноразмерных частиц оксидов металлов показано отсутствие значимой взаимосвязи между количеством предъявлений и концентрацией металла в обонятельных луковицах. Это обстоятельство ставит вопрос о возможном снижении эффективности захвата твердых частиц ольфакторным эпителием при повторных поступлениях в носовую полость. В данной работе проведено сравнение эффективности назального транспорта магнито-контрастных наночастиц при их однократном и многократном интраназальном введении и оценено их воздействие на морфофункциональные характеристики ольфакторной системы. Согласно полученным данным, накопление $MnO-NP$ в обонятельных луковицах мышей снижается при их повторных интраназальных аппликациях. Кроме того, снижение эффективности ольфакторного транспорта, наблюдаемое при многократном введении $MnO-NP$, частично восстанавливается при интраназальной аппликации муколитика (0.01 M N-ацетил-L-цистеин). При этом концентрация частиц в обонятельных луковицах была пропорциональна объему данной структуры, который, в частности, зависит от количества синаптических контактов между обонятельными луковицами и ольфакторным эпителием. Следует отметить, что при многократном введении $MnO-NP$ у мышей снижается толщина ольфакторного эпителия. Таким образом, при многократном интраназальном введении $MnO-NP$ снижается эффективность ольфакторного транспорта наночастиц из носовой полости в мозг, что сочетается с увеличением вязкости мукозального слоя и снижением количества синаптических контактов между обонятельными луковицами и ольфакторным эпителием. Полученные результаты свидетельствуют о наличии естественных механизмов защиты ольфакторного эпителия от проникновения патогенов и ксенобиотиков и позволяют сформулировать конкретные практические рекомендации, касающиеся интраназальной аппликации лекарственных препаратов.

Ключевые слова: наночастицы; интраназальное введение; магнитно-резонансная томография; назальный транспорт.

Olfactory transport efficiency of the manganese oxide nanoparticles (II) after their single or multiple intranasal administrations

A.V. Romashchenko^{1, 2}✉, M.B. Sharapova¹, D.V. Petrovskii¹, M.P. Moshkin¹

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

² Institute of Computational Technologies SB RAS, Novosibirsk, Russia

In experiments with reusable inhalation of nano-sized metal oxide particles, it has been shown that there is no significant relationship between the number of presentations and the metal concentration in the olfactory bulb. This fact raises the question of a possible decrease in the efficiency of particulate capturing by the olfactory epithelium after their repeated application into the nasal cavity. In this study, we compared the effectiveness of nasal transport of paramagnetic nanoparticles after their single and multiple intranasal administration and evaluated their effects on the morphological and functional characteristics of the olfactory system. Based on the data, the accumulation of $MnO-NPs$ in the olfactory bulb of mice was reduced after repeated intranasal application. In addition, the decrease in the efficiency of olfactory transport observed after repeated administration of $MnO-NPs$ was partially restored by intranasal application of mucolytic (0.01 M N-acetyl-L-cysteine). In this case, the concentration of particles in the olfactory bulb was proportional to the volume of the structure, which in particular depends on the number of synaptic contacts between the mitral cell of the olfactory bulb (OB) and olfactory epithelium (OE). It should be noted that multiple intranasal injections of $MnO-NPs$ reduce mouse OE thickness. Thus, repeated intranasal introduction of $MnO-NPs$ reduces the efficiency of nanoparticle olfactory transport from the nasal cavity to the brain, which is combined with the increase in the viscosity of the mucosal layer and the reduction in the number of synaptic contacts between OB and OE. These results indicate the presence of the natural mechanisms of protection against the penetration of pathogens and xenobiotics into the olfactory epithelium; they also allow us to formulate practical recommendations on intranasal drugs delivery.

Key words: nanoparticles; intranasal administration; magnetic resonance imaging; nasal transport.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Ромащенко А.В., Шарапова М.Б., Петровский Д.В., Мошкин М.П. Эффективность ольфакторного транспорта наночастиц оксида марганца (II) при однократном или многократном интраназальном введении. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(3):304-311. DOI 10.18699/VJ17.248

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Romashchenko A.V., Sharapova M.B., Petrovskii D.V., Moshkin M.P. Olfactory transport efficiency of the manganese oxide nanoparticles (II) after their single or multiple intranasal administrations. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(3):304-311. DOI 10.18699/VJ17.248

В процессе своей жизнедеятельности организм постоянно подвергается воздействию твердых аэрозолей (ТА), в состав которых могут входить разнообразные ксенобиотики. Оседая на слизистых верхних и нижних дыхательных путей, различные компоненты ТА способны проникать в кровь и, как следствие, накапливаться во внутренних органах. Кроме того, целый ряд твердых частиц различной природы (вирусы, оксиды металлов и т. д.) способен проникать в центральную нервную систему (ЦНС) в обход гемато-энцефалического барьера с поверхности слизистой носовой полости (Sherry Chow et al., 2008; Minoshima, Cross, 2008). Предположительно, механизм подобного транспорта заключается в захвате введенного соединения клетками ольфакторного эпителия и последующем перемещении в более глубокие структуры мозга. В ЦНС с помощью назального транспорта проникают преимущественно ультратонкие частицы размером < 0.5 мкм (Mistry et al., 2009). Известно, что несколько групп вирусов попадают в ЦНС млекопитающих главным образом через ольфакторный путь. В экспериментах на обезьянах, которых интраназально заражали вирусом полиомиелита, были получены первые доказательства прямого поступления наночастиц из носовой полости в мозг. Однако разрушение ольфакторного эпителия сульфатом цинка предотвращало проникновение вируса в мозг (Faber et al., 1944). В ряде работ продемонстрировано, что интраназальная аппликация мышам и крысам наночастиц оксидов марганца, титана и кремния также приводит к их накоплению в головном мозге, и в первую очередь в ольфакторных луковицах (Oberdorster et al., 2004; Elder et al., 2006; Wang et al., 2008; Wu et al., 2011). Отмечено также, что ингаляция наноразмерного аэрозоля оксида марганца животным с окклюзией одной ноздри сопровождается существенным ростом концентрации металла в ольфакторной луковице, расположенной ипсилатерально по отношению к открытому носовому ходу. В контралатеральной луковице содержание Mn остается на уровне контроля (Elder et al., 2006).

При сравнении токсичности растворимых и нерастворимых форм различных ксенобиотиков были обнаружены определенные особенности. На культуре клеток A549 было показано, что суперпарамагнитные частицы железа способны вызывать одноцепочечные разрывы ДНК. Токсичность твердых частиц может также проявляться в том, что, проникая в клетку с помощью эндоцитоза, они подвергаются частичному растворению и тем самым создают более высокую локальную концентрацию ионов (Chattopadhyay et al., 2015). Кроме того, в исследовании, проведенном на культуре клеток PC-12, продемонстрировано, что как оксид марганца (40 нм), так и хлорид марганца (II) снижает концентрацию дофамина и его метаболитов, при этом концентрация свободных радикалов в пять раз выше при добавлении в культуру оксида марганца по сравнению с аналогичной дозой $MnCl_2$ (Hussain et al., 2006). Помимо того, целый ряд неорганических наночастиц способен при попадании внутрь клетки подавлять активность митохондрий (Hussain et al., 2006). Таким образом, проникновение твердых частиц бактериальной, вирусной или неорганической природы из носовой полости в мозг может провоцировать развитие различных неврологических

нарушений. Так, одним из первых симптомов развития ряда деменций (болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера и др.) является нарушение восприятия запаховых стимулов, поэтому воздействия факторов среды, в том числе компонентов вдыхаемых аэрозолей, рассматривают в качестве возможных экологических факторов риска для данных заболеваний (Calderón-Garcidueñas et al., 2013).

В экспериментах с многократным ингаляционным введением наноразмерных частиц оксидов металлов показано отсутствие значимой взаимосвязи между количеством предьявлений и концентрацией металла в обонятельных луковицах (Elder et al., 2006; Yu et al., 2007). Это косвенно указывает на снижение захвата твердых частиц ольфакторным эпителием в процессе их многократного поступления в носовую полость. Однако среди научных публикаций отсутствуют работы, посвященные прямому изучению изменений ольфакторного транспорта наночастиц при их повторных ингаляциях.

Наиболее вероятный путь проникновения твердых частиц из носовой полости в мозг – нейрональный захват (ольфакторные нейроны, нейроны тройничного нерва) и их последующий аксональный транссинаптический транспорт в более глубокие структуры мозга. Участие клеточного транспорта в перемещении твердых частиц из носовой полости в мозг было показано на примере интраназальной аппликации вирусных наночастиц, которое нарушается при введении ингибиторов аксонального транспорта и индуцированном апоптозе ольфакторных нейронов (Faber et al., 1944). Кроме физико-химических свойств самих частиц, на эффективность назального транспорта компонентов ТА влияет их взаимодействие с мукозальным слоем ольфакторного эпителия, проницаемость которого в первую очередь определяется вязкостью секрета, продуцируемого клетками желез назального эпителия, и интенсивностью продукции слизи. Возрастание вязкости продуцируемой слизи является одним из основных симптомов таких заболеваний, как муковисцидоз и хроническая обструктивная болезнь легких, а увеличение интенсивности продукции секрета наблюдается, например, при различных видах ринита (аллергический, вазомоторный и др.) (Kim, Ho, 2010). Данных о влиянии ТА на морфофункциональное состояние мукозального слоя слизистых практически нет.

Марганец (II) способен уменьшать время релаксации протонов при проведении магнитно-резонансной томографии (МРТ), что позволяет довольно точно определить места его локализации при различных способах введения. Опираясь на это свойство марганцевых соединений, ранее нами было показано, что через 12 ч после однократного интраназального введения мышам магнитоконтрастных наночастиц оксида марганца ($MnO \cdot nH_2O$) наблюдается значительное увеличение уровня МРТ-сигнала в обонятельных луковицах животных вследствие увеличения концентрации марганца в данных структурах (Moshkin et al., 2014). Поскольку оксиды марганца – крайне слабо-растворимые соединения даже при лизосомальных pH ($pH \sim 4.0$ (Elder et al., 2006)), наблюдаемое нами увеличение МРТ-сигнала в обонятельных луковицах мыши было связано с накоплением именно частиц марганца, а не ионов (Mn^{2+}). В данном исследовании, с использованием

T1-взвешенной МРТ, *in vivo* охарактеризовано накопление MnO-НЧ в обонятельных луковицах и обонятельном эпителии мыши при их однократном и многократном интраназальном введении. Далее с помощью поведенческого тестирования и гистологических методов были описаны изменения запахового восприятия и морфологических характеристик обонятельного эпителия при однократном и многократном интраназальном предъявлении наночастиц. Для оценки состояния обонятельного эпителия использовались два параметра: его толщина, которая изменяется при массовой гибели обонятельных нейронов (Hurt et al., 1988), и объем обонятельных луковиц, который, в частности, определяется количеством синаптических контактов между обонятельными нейронами и митральными клетками (внешний плексиморфный слой (Bhatnagar et al., 1987)).

Материалы и методы

Животные. Работа выполнена на базе Центра генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН (RFMEFI6161914X0005). Эксперименты поставлены на самцах мышей SPF-статуса инбредной линии C57BL/6J в возрасте 12–14 нед. (28–32 г). После отсадки в 3-недельном возрасте и до исследований мышей содержали группами по пять особей одного пола в стандартных клетках (35 × 25 × 12 см) при температуре 22–24 °C и искусственном световом режиме 14C:10T. Брикетированный корм («Чара», Павловский Посад) и воду мыши получали *ad libitum*. В качестве подстилочного материала применяли обеспыленные древесные опилки.

Интраназальное введение MnO. Для получения наночастиц MnO (MnO-НЧ) к 0.5 мл 0.2 М раствора MnCl₂, содержащего 12 % Tween 20, добавляли 0.5 мл 0.4 М раствора KOH, содержащего 16 % Tween 20, после чего активно перемешивали с помощью вортекса в течение 30 с. Далее полученные частицы отмывали, для чего их осаждали центрифугированием при 12000 об./мин в течение 15 мин. После удаления надосадочной жидкости к осадку частиц добавляли деионизированную воду в объеме, равном объему исходного раствора, и сонифицировали в течение 1 ч при температуре 22 °C на ультразвуковом гомогенизаторе QSonica Q700 с погружным зондом Cup Horn (5.5" cup) (QSonica, США) (110 В, 50/60 Гц, частота 20 кГц, мощность 300 Вт/л; число циклов ON/OFF (30 с / 30 с) – 60). Процедуру отмывки проводили четыре раза, после чего получали стабильный раствор MnO-НЧ. Количество Tween 20 в получившемся коллоиде определяли с помощью UV-спектрофотометрии (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, США) на длинах волн 210–280 нм, где интенсивность поглощения данного соединения максимальна (Xia, Xu, 2006). Исходя из полученных данных, концентрация Tween 20 в растворе MnO-НЧ после отмывок не превышала 0.5 %. Таким образом, суточная доза полисорбата-20, которую получали животные в эксперименте, составляла 2 мг/кг, что на порядок ниже максимально допустимой суточной дозы 25 мг/кг (Bartsch et al., 1975). Физико-химические характеристики использованных частиц представлены на рис. 1.

Морфологию и размеры MnO-НЧ (см. рис. 1, а) изучали с помощью трансмиссионной электронной микроскопии

JEM 1400 (JEOL, Япония) с цифровой камерой Veleta (SIS, Германия). Препараты сорбировали в течение 30 с на медные сетки (copper grids), покрытые формваровой пленкой (formvar-coated), стабилизированной напылением углерода с помощью Vacuum Evaporator JEE-420 (JEOL, Япония). Излишки жидкости удаляли фильтровальной бумагой, сетки высушивали на воздухе. В каждом препарате определяли средний размер НЧ путем измерения 100 частиц с четкими границами с помощью программы iTEM, версия 5.2 (JEOL, Япония). Средний диаметр (Mean ± SD) MnO-НЧ составлял 138 ± 53 нм (см. рис. 1, а). Характеристику кристаллической решетки использованных в работе наночастиц (Mn₃O₄-НЧ, Mn₂O₃-НЧ, MnO-НЧ) проводили с помощью порошковой дифрактометрии на станции синхротронного излучения (ВЭПП-3, ИЯФ СО РАН) (Evdokov et al., 2009). Это метод, основанный на рентгеновской дифракции, наиболее подходит для идентификации и характеристики кристаллических фаз в веществе. Дифракцию от образца снимали в монохроматическом излучении с длиной волны 0.1516 нм в диапазоне углов от 45 до 75°. Идентификация фаз осуществлялась с использованием базы данных программы Match, разработанной фирмой Crystal Impact. Было установлено, что коллоид является монофазным оксидом марганца MnO и частицы, входившие в его состав, не имели сформированной кристаллической решетки.

Параметры MnO-НЧ в суспензии определяли методом динамического светорассеяния при углах рассеяния 90° и температуре 22 °C и электрофореза с помощью Zetasizer NanoZS (Malvern, Великобритания) в соответствии с протоколом производителя (см. рис. 1, б).

Марганец является парамагнетиком, поэтому способен сокращать время спин-решетчатой релаксации (T1). Для MnO-НЧ были получены характеристические времена релаксации на сверхвысокопольном томографе BioSpec 117/16 USR (Bruker, Германия) – 11.7 Тл. Обратная величина релаксации (T1⁻¹, мс⁻¹) находилась в прямо пропорциональной зависимости от концентрации марганца для MnO-НЧ (см. рис. 1, в).

Схема экспериментов. При исследовании накопления MnO-НЧ в обонятельных луковицах мышей ненаркотизированным животным вводили в одну (эксперимент с однократным введением) или в обе ноздри (эксперимент с многократным введением) коллоидные растворы наночастиц по 10 мкл на ноздрю.

При однократном интраназальном введении физиологический раствор (группа 1, n = 6) или коллоидный раствор наночастиц (группа 2, n = 6) вводился в одну ноздрю за 12 ч до МРТ-сканирования. С помощью полученных T1-взвешенных МРТ-изображений определяли накопление наночастиц в ткани. Ранее нами была показана высокодоверенная корреляция между уровнем МРТ-сигнала и концентрацией наночастиц MnO в ткани (Moshkin et al., 2014). Также с помощью T1-взвешенных МРТ-изображений у мышей определяли накопление MnO-НЧ в обонятельном эпителии. Далее оценивали поведенческий ответ каждой особи на запах воды и загрязненной самками (C57BL/6J) подстилки. После окончания всех тестов животных групп забивали и отбирали гистологический материал для определения толщины обонятельного эпителия.

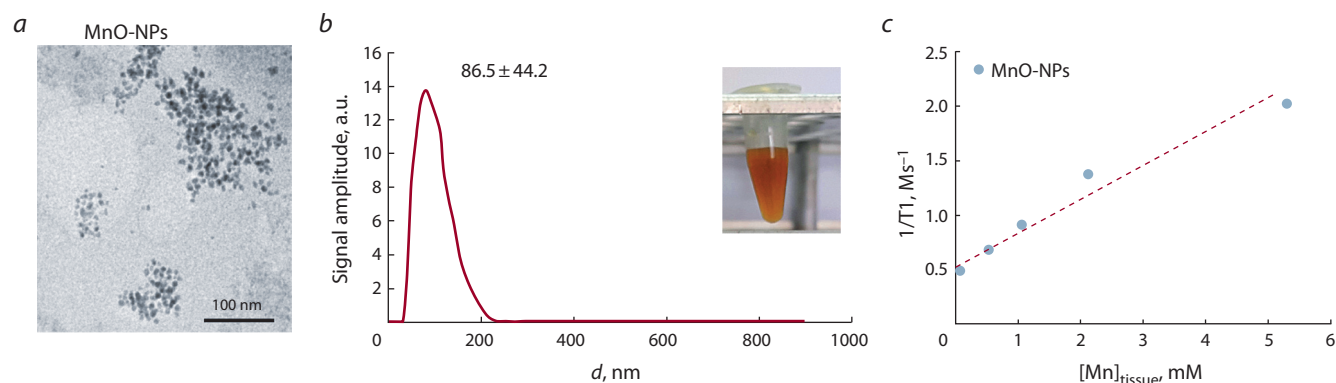


Fig. 1. Physicochemical characteristics of MnO-NPs.

(a) transmission electron microscopy of MnO-NPs; (b) characterization of the distribution of MnO-NPs hydrodynamic radius values in colloidal solution by dynamic light scattering; (c) characterization of MnO-NPs as an MRI contrast (dependence of the proton spin-lattice relaxation time (T1) on manganese concentration in aqueous colloidal MnO-NP solution).

При исследовании накопления наночастиц в обонятельных луковицах при многократном введении MnO-НЧ коллоидный раствор частиц вводили мышам (группа 3, $n = 6$) в одну ноздрю в объеме 10 мкл. Интраназальную аппликацию наночастиц проводили в течение 6 недель два раза в неделю, так чтобы между введениями проходило не менее 2 дней. Таким образом, общее количество введений (n) составило 12. После 12-го введения мышам проводили МРТ-исследование и с помощью T1-взвешенных изображений оценивали накопление MnO-НЧ в обонятельных луковицах и ольфакторном эпителии. Далее в ольфакторном тесте исследовали поведенческий ответ каждой особи на запах загрязненной самками (C57BL/6J) подстилки.

Для исследования влияния муколитика на захват частиц, мышам группы 3 по окончании поведенческого тестирования интраназально вводили в каждую ноздрю по 10 мкл 0.01 M N-ацетил-L-цистеина (АЦЦ®), после чего через 20 мин в одну ноздрю вводили 10 мкл MnO-НЧ и через 12 ч проводили МРТ-сканирование. После окончания всех тестов животных группы 3 забивали и отбирали гистологический материал для определения толщины ольфакторного эпителия.

МРТ-исследования. Накопление MnO-НЧ в обонятельных луковицах мыши было исследовано с помощью магнитно-резонансной томографии на сверхвысокопольном томографе BioSpec 117/16 USR (Bruker, Германия) – 11.7 Тл.

За 5 мин до исследования мышей обездвигивали газовым наркозом (Isofluran, Baxter Healthcare Corp., США) при помощи наркозного аппарата (The Univentor 400 Anaesthesia Unit, Univentor, Мальта). Температуру животных поддерживали с помощью водного контура в томографическом столике-кроватке, имевшем температуру поверхности 30 °C. Под нижнюю часть туловища помещали пневматический датчик дыхания (SA Instruments, Stony Brook, N. Y., США), что позволяло контролировать глубину наркоза.

Информация о распределении марганца по структурам мозга мыши была получена по результатам T1-взвешенных изображений с использованием метода FLASH (fast low angle shot). Параметры импульсной последователь-

ности метода: TE = 2.5 мс, TR = 200 мс; параметры изображения: размер 2.5×2.5 см, матрица 512×512 точек, толщина среза 0.5 мм, расстояние между срезами 0.5 мм, количество срезов 15, ориентация срезов аксиальная; общее время сканирования 6 мин.

Для приведения к нормальному распределению значения интенсивности МРТ-сигнала логарифмировали – $\log_2(\text{МРТ-сигнал})$. Обработку МРТ-сканов проводили в программе ImageJ.

Ольфакторный тест выполнялся по модифицированной схеме habituation–dishabituation (Schellinck et al., 1995). Поведенческое тестирование проводили через двое суток после МРТ-сканирования и наркотизации. Клетку с чистым подстилом и двумя пустыми пробирками (1.5 мл), прикрепленными с помощью скотча к противоположным стенкам клетки, помещали под вытяжку. Далее тестируемому животному давали свободно перемещаться по клетке в течение 10 мин, после чего, не вынимая животное из клетки, в пробирки аккуратно помещали запаховый стимул. Далее в течение 2 мин с помощью цифровой камеры регистрировали поведение животного. В качестве запаховых стимулов использовали дистиллированную воду и загрязненную подстилку из клетки, где в течение 5 дней содержалось 5 самок, возраст которых составлял 10–12 недель. Для оценки поведенческого ответа животного на предоставляемые запаховые стимулы на полученных видеозаписях подчитывали время обнюхивания каждой пробирки. Обнюхиванием считалось вставание на задние лапки непосредственно рядом с запаховым стимулом (рис. 2, з).

Гистология носовой полости. После проведения МРТ и поведенческих тестов животное умерщвляли, используя 100 % углекислый газ, который подавали в герметично закрытую клетку с животным внутри в течение как минимум 2 мин со скоростью 200 мл/мин. Перед отделением головы от туловища носовую полость мыши промывали 10 % забуференным формалином, после чего череп с удаленными мягкими тканями и мышцами помещали в 4 % формалин и держали в нем не менее суток. Затем проводили декальцинацию с помощью раствора «Трилон-Б» в течение 4 сут, после чего череп заливали парафином, готовили коронар-

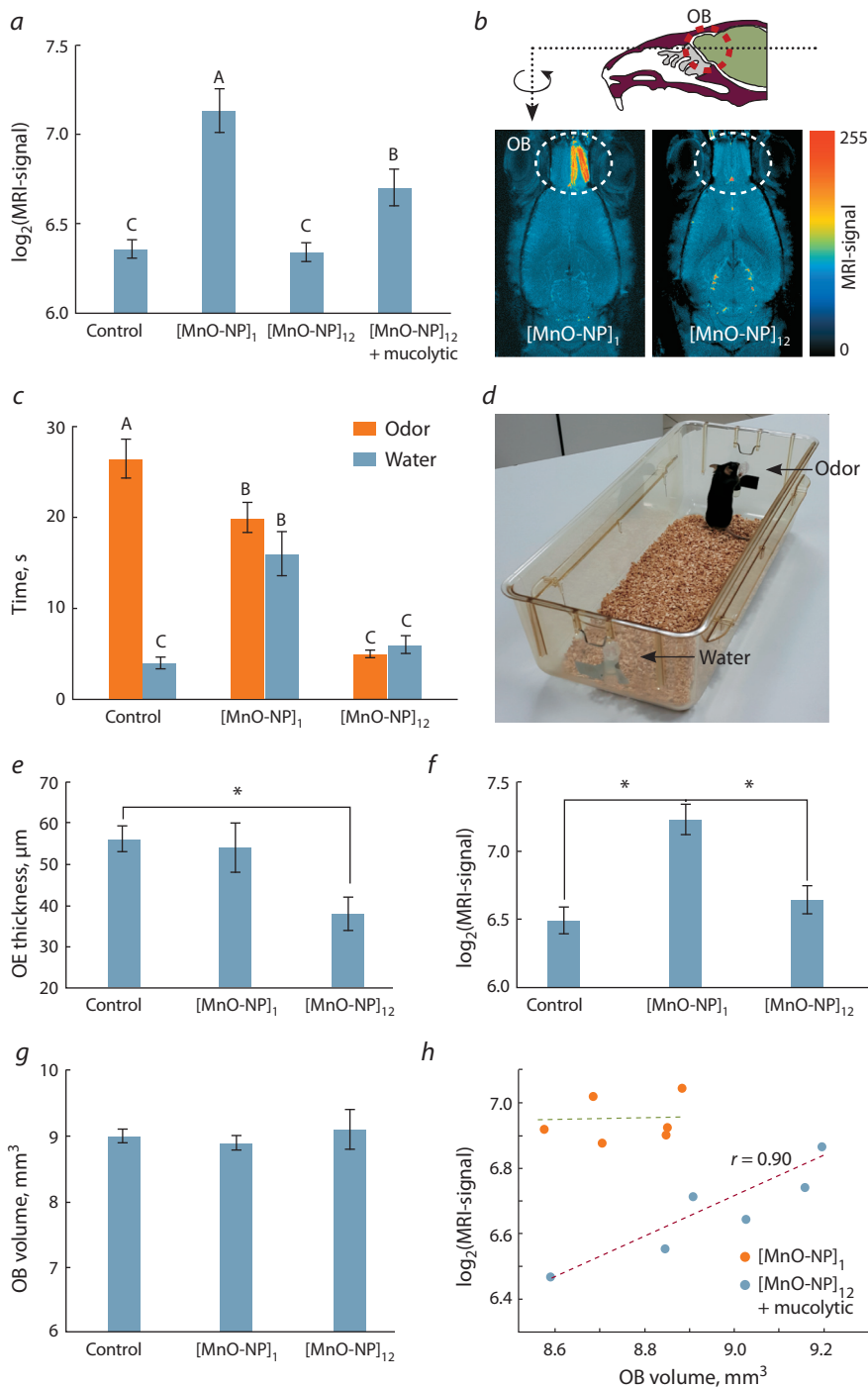


Fig. 2. Comparison of the efficiency of MnO-NP olfactory transport after single and multiple intranasal NP administration and characterization of the factors influencing this process.

(a) MRI signal intensity in a mouse olfactory bulb (OB) 12 hours after MnO-NPs administration. (b) Coronal T1-weighted MR images of MnO-NP accumulation in OB taken 12 hours after intranasal NP administration. (c) The behavioral response of C57BL/6J males of groups 1–3 to the odor of females' litter and distilled water. (d) The device for olfactory testing. (e) Comparison of olfactory epithelium thickness in groups 1–3. (f) The signal level in T1-weighted MR images from the olfactory epithelium region in mice, groups 1–3, recorded 12 hours after MnO-NPs intranasal administration. (g) Comparison of OB volume in individuals of groups 1–3. (h) Correlation coefficient of OB volume with the MRI signal level in OB 12 hours after intranasal MnO-NP administration.

Notes. A, B, C, significant differences (LSD-test, $p < 0.05$). * Significant differences (Student t test, $p < 0.05$). Control group (group 1): individuals having been intranasally treated with saline once. [MnO-NP]₁ (group 2) and [MnO-NP]₁₂ (group 3) are animals having been intranasally treated with [MnO-NP]₁ or 12 times, respectively. [MnO-NP]₁₂ + mucolytic drugs are mice from the [MnO-NP]₁₂ – group treated with mucolytic drug 10 μ l (0.01M N-acetyl-L-cysteine) 20 minutes prior to intranasal nanoparticle injection.

ные срезы толщиной 5 μ м, которые впоследствии окрашивали гематоксилином и эозином. Морфологические исследования выполняли с помощью поляризационного микроскопа Axio Imager (Carl Zeiss, Германия) в проходящем свете с цифровой камерой AxioCam ERc5s. Полученные данные анализировали с помощью свободно распространяемого пакета программ ImageJ. Для каждого животного обсчитывали по три коронарных гистологических среза носовой полости мыши, сделанных в области ольфакторного эпителия на расстоянии не менее 0.5 мм друг от друга. На каждом срезе проводили измерение толщины ольфакторного эпителия не менее чем в 20 различных участках носовой полости.

Статистика. Для сравнения двух средних использовали t -тест Стьюдента. Для множественных сравнений средних использовали LSD-тест (least significant difference). Взаимозависимости исследуемых признаков оценивали с помощью параметрического коэффициента корреляции Пирсона. Данные выражали как средние $\pm$ SE.

Результаты

Уровень позитивного MPT-контраста, измеренный в ольфакторных луковицах через 12 ч после однократной интраназальной аппликации MnO-NЧ (группа 2), существенно превосходил таковой у контрольных особей (см. рис. 2, а, LSD-тест, $p < 0.05$). Вместе с тем после многократного введения наночастиц уровень сигнала не отличался от контроля и был существенно ниже, чем у мышей, которым MnO-NЧ вводили однократно (см. рис. 2, а, б, LSD-тест, $p < 0.05$).

При исследовании поведенческой реакции на запаховые стимулы было установлено, что только самцы контрольной группы (группа 1) демонстрировали большее время обнюхивания пробирки с подстилкой, загрязненной самками, чем пробирки с водой (см. рис. 2, в, з, LSD-тест, $p < 0.05$). Животные 2-й и 3-й групп тратили одинаковое время на обнюхивание обоих стимулов (LSD-тест, $p > 0.05$). Кроме того, особи 3-й группы в течение теста обнюхивали запаховые стимулы менее продолжительно по сравнению с группами 1 и 2 (см. рис. 2, в, LSD-тест, $p < 0.05$).

Для оценки вклада вязкости мукозального слоя в снижение эффективности захвата наночастиц ольфакторным эпителием при многократном введении MnO-НЧ, животным 3-й группы после окончания ольфакторного тестирования вводили в нос муколитик (0.01 M N-ацетил-L-цистеин), затем через 20 мин интраназально апплицировали MnO-НЧ. Далее через 12 ч проводили повторное МРТ-сканирование. Исходя из полученных результатов, введение муколитика достоверно усилило уровень МРТ-сигнала в обонятельных луковицах животных группы 3 как по сравнению с контролем, так и по сравнению с предыдущим сканированием (LSD-тест, $p < 0.05$). Тем не менее значения МРТ-сигнала в обонятельных луковицах у этих особей были достоверно ниже, чем у животных, которым вводили MnO-НЧ однократно (см. рис. 2, а, LSD-тест, $p < 0.05$).

Для оценки морфологических изменений, происходящих в ольфакторном эпителии и обонятельных луковицах мыши при однократном и многократном интраназальном введении наночастиц, мы использовали Т1-взвешенные МРТ-изображения и гистологические срезы носовой полости животного (см. рис. 2, б–ж). Многократное интраназальное введение MnO-НЧ приводило к достоверному снижению толщины ольфакторного эпителия по сравнению как с контрольной группой животных, так и с особями, которым MnO-НЧ вводили однократно (t-тест Стьюдента, $p < 0.05$). При этом однократное введение наночастиц не влияло на толщину ольфакторного эпителия (см. рис. 2, б, t-тест Стьюдента, $p > 0.05$). Исследование с помощью Т1-взвешенной МРТ накопления MnO-НЧ в обонятельном эпителии показало, что при однократном введении наблюдалось достоверное увеличение МРТ-сигнала в ольфакторном эпителии по сравнению с контрольной группой и с особями, которым MnO-НЧ вводили многократно (см. рис. 2, в, LSD-тест, $p < 0.05$). Ни у одной из трех групп достоверных различий в объемах обонятельных луковиц не обнаружено (см. рис. 2, ж).

Индивидуальные вариации объема и интенсивности МРТ-сигнала в обонятельных луковицах, отражающего накопление марганца, не коррелировали между собой при однократном введении MnO-НЧ. Вместе с тем в группе животных, которым MnO-НЧ вводили многократно, интенсивность накопления марганца в обонятельных луковицах через 12 ч после их совместного с муколитиком интраназального предъявления высокодостоверно коррелировала с объемом обонятельных луковиц (см. рис. 2, з, $r = 0.90$, $p = 0.012$).

Обсуждение

В данной работе нами показано, что однократное интраназальное введение магнито-контрастных MnO-НЧ приводит к значительному увеличению концентрации частиц в обонятельных луковицах мыши. При этом уровень МРТ-сигнала в луковицах мышей контрольной группы и животных, которым вводили MnO-НЧ в течение 6 недель, не различался. В предварительных экспериментах установлено, что концентрация марганца в обонятельных луковицах при однократном интраназальном введении MnO-НЧ за 4 недели снижается до фоновых значений. Исходя из этого можно предположить, что отсутствие раз-

ницы в уровне МРТ-сигнала в обонятельных луковицах контрольной группы мышей и особей, которым многократно вводили MnO-НЧ, является следствием снижения эффективности захвата твердых частиц ольфакторным эпителием при многократном предъявлении частиц. Подобные результаты были получены в экспериментах с многократным субхроническим ингаляционным введением наноразмерных металлических частиц. Концентрация частиц в обонятельных луковицах в этих экспериментах при интраназальном введении определяется концентрацией частиц в предъявляемом коллоидном растворе, а не количеством аппликаций (Yu et al., 2007). Снижение эффективности захвата частиц окончаниями обонятельных нервов может быть следствием двух независимых процессов: с одной стороны, уменьшения количества ольфакторных рецепторных клеток, которые, вероятнее всего, захватывают твердые частицы с помощью эндоцитоза из носовой полости и перемещают их в более глубокие структуры мозга (Mistry et al., 2009), а с другой стороны, изменения вязкости мукозального слоя, одна из функций которого – защита эпителия от оседающих на его поверхности патогенов и ксенобиотиков (Cone, 2009).

Как говорилось выше, наиболее вероятный путь проникновения твердых частиц из носовой полости в мозг – это аксональный транспорт. Участие аксонального транспорта в процессе перемещения ксенобиотиков из носовой полости в мозг было продемонстрировано на примере движения вируса полиомиелита, герпеса и интраназального введения хлорида марганца. В обоих случаях предпочтительное введение в нос колхицина, ингибитора полимеризации тубулина, блокировало их накопление в обонятельных луковицах (Faber et al., 1944; Mikloska et al., 1999; Pautler, Koretsky, 2002). В нашей работе для оценки морфологических изменений в ольфакторной системе вследствие интраназальной аппликации наночастиц мы использовали два параметра: толщину ольфакторного эпителия и объем обонятельных луковиц. При массовой гибели ольфакторных нейронов, с одной стороны, должна уменьшиться толщина эпителия (Hurt et al., 1988), с другой, исходя из данных литературы, ольфакторные дисфункции различного генеза (например, инфекционные, токсические, возрастные) приводят к изменению объема обонятельных луковиц за счет снижения количества синаптических контактов между ольфакторными нейронами и митральными клетками (Bhatnagar et al., 1987). Согласно полученным результатам, однократное введение частиц не приводило к значимым морфологическим изменениям толщины ольфакторного эпителия и объема обонятельных луковиц. При этом многократное введение наночастиц мышам достоверно снижало толщину их обонятельного эпителия, но на объем ольфакторных луковиц достоверного влияния не оказывало. Учитывая, что при интраназальном введении сульфата цинка изменения в толщине ольфакторного эпителия возможно зафиксировать уже через сутки (Matulionis, 1975), можно заключить, что однократное закапывание MnO-НЧ в нос мыши, в отличие от субхронического, не приводит к достоверным морфологическим изменениям в обонятельном эпителии. Таким образом, гибель клеток в ольфакторном эпителии при многократном введении частиц может вносить вклад

в процесс снижения эффективности захвата и транспорта твердых частиц из носовой полости в мозг.

В нашем эксперименте снижение времени обонявания подстилки с запахом самок наблюдалось не только у самцов с выраженными морфологическими изменениями ольфакторного эпителия, которым MnO-НЧ вводили в нос многократно, но и у самцов без выраженных изменений в толщине обонятельного эпителия, которым частицы вводились только один раз. Возможность того, что уже однократное интраназальное введение наночастиц приводит к функциональным нарушениям в работе ольфакторной системы, имеет важное патогенетическое значение. Нарушение обоняния служит диагностическим критерием таких нейродегенеративных заболеваний, как болезнь Паркинсона и болезнь Альцгеймера (Meshulam et al., 1998). Кроме того, у пациентов с подтвержденным клиническим диагнозом «депрессия» наблюдается нарушение в работе ольфакторной системы. При этом ольфакторная дисфункция рассматривается в качестве одной из возможных причин развития депрессии, что подтверждено на различных экспериментальных моделях, в которых у животных искусственно подавляли восприятие запаховых стимулов с помощью бальбектомии или разрушения обонятельного эпителия, чем вызывали поведенческие, иммунные, эндокринные и биохимические изменения, характерные для депрессивного состояния (Harkin et al., 2003).

Первым барьером на пути проникновения твердых частиц из носовой полости в мозг является мукозальный слой, который представляет собой пористый гель, защищающий поверхность ольфакторного эпителия от проникновения различных патогенов и ксенобиотиков. Показано, что твердые частицы в основном преодолевают мукозальный слой через поры, в которых вязкость секрета значительно ниже, чем в остальной части мукозального геля (Olmsted et al., 2001). Так, при муковисцидозе диаметр и количество пор значительно снижаются, что становится непреодолимым барьером даже для вирусных частиц (Verkman et al., 2003) и причиной очень низкой эффективности *in vivo* генной трансфекции, тем самым затрудняя лечение данного заболевания (Kitson et al., 1999). Для оценки вклада изменения вязкости мукозального слоя в снижение эффективности захвата твердых частиц ольфакторным эпителием при многократном предъявлении MnO-НЧ, мы использовали муколитик, который при предварительном интраназальном введении значительно повышал интенсивность накопления в обонятельных луковицах мыши введенных в нос MnO-НЧ. Кроме того, в пользу гипотезы об увеличении вязкости мукозального слоя при многократном интраназальном введении наночастиц говорит то, что в отличие мышей, которым MnO-НЧ вводился в нос только один раз, у животных, подвергшихся многократной интраназальной аппликации, предъявление MnO-НЧ без муколитика не вызывало накопления марганца не только в обонятельных луковицах, но и в поддерживающих и рецепторных клетках ольфакторного эпителия (см. рис. 2, а). При этом предварительное введение муколитика усиливало накопление частиц во всем ольфакторном эпителии, а не только в ольфакторных нейронах. Полученные результаты свидетельствуют о вкладе процесса увеличения вязкости

мукозального слоя в снижение проницаемости ольфакторного эпителия для наночастиц.

Таким образом, в наблюдаемое нами снижение эффективности захвата твердых частиц ольфакторным эпителием мыши при их многократном интраназальном предъявлении вносят вклад два основных процесса: гибель ольфакторных нейронов и увеличение вязкости мукозального слоя. В пользу совместного действия этих факторов свидетельствует то, что при предварительном интраназальном предъявлении муколитика мышам, которым субхронически вводили в нос MnO-НЧ, транспорт наночастиц в мозг напрямую ($r = 0.90$, см. рис. 2, з) зависел от объема обонятельных луковиц. В то же время известно, что объем глобулярного слоя ОЛ, где расположены синаптические контакты митральных клеток и ольфакторных нейронов, составляет до 30 % объема всей луковицы (Royet et al., 1988). Полученные результаты свидетельствуют о наличии естественных механизмов защиты ольфакторного эпителия от проникновения патогенов и ксенобиотиков, а также позволяют сформулировать конкретные практические рекомендации, касающиеся интраназальной аппликации лекарственных препаратов, а именно: предпочтительное снижение частоты интраназальных введений и увеличение дозировки.

Acknowledgments

This study was supported by the Russian Science Foundation, project 14-14-00221.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Bartsch W.G.K.G., Sponer G., Dietmann K., Fuchs G. Acute toxicity of various solvents in the mouse and rat. LD50 of ethanol, diethylacetamide, dimethylformamide, dimethylsulfoxide, glycerine, N-methylpyrrolidone, polyethylene glycol 400, 1, 2-propanediol and Tween 20. *Arzneimittel-Forschung*. 1975;26(8):1581-1583.
- Bhatnagar K.P., Kennedy R.C., Baron G., Greenberg R.A. Number of mitral cells and the bulb volume in the aging human olfactory bulb: A quantitative morphological study. *Anatomical Record*. 1987; 218(1):73-87.
- Calderón-Garcidueñas L., Franco-Lira M., Mora-Tiscareño A., Medina-Cortina H., Torres-Jardón R., Kavanaugh M. Early Alzheimer's and Parkinson's disease pathology in urban children: Friend versus foe responses – it is time to face the evidence. *BioMed Res. International*. 2013;2013:161687.
- Chattopadhyay S., Dash S.K., Tripathy S., Das B., Mandal D., Pramanik P., Roy S. Toxicity of cobalt oxide nanoparticles to normal cells; an *in vitro* and *in vivo* study. *Chem.-Biol. Interact.* 2015;226: 58-71.
- Cone R.A. Barrier properties of mucus. *Advanced Drug Delivery Rev.* 2009;61(2):75-85.
- Elder A., Gelein R., Silva V., Feikert T., Opanashuk L., Carter J., Potter R., Maynard A., Ito Y., Finkelstein J., Oberdorster G. Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system. *Environ. Health Perspectives*. 2006;114(8):1172-1178.
- Evdokov O.V., Titov V.M., Tolochko B.P., Sharafutdinov M.R. *In situ* time-resolved diffractometry at SSTRC. *Nucl. Instruments and Methods in Physics Res. A*. 2009;603(1):194-195.
- Faber H.K., Silverberg R.J., Dong L. Poliomyelitis in the cynomolgus monkey. *J. Exp. Med.* 1944;80(1):39-57.
- Harkin A., Kelly J.P., Leonard B.E. A review of the relevance and validity of olfactory bulbectomy as a model of depression. *Clin. Neurosci. Res.* 2003;3(4-5):253-262.

- Hurt M.E., Thomas D.A., Working P.K., Monticello T.M., Morgan K.T. Degeneration and regeneration of the olfactory epithelium following inhalation exposure to methyl bromide: Pathology, cell kinetics, and olfactory function. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1988;94(2):311-328.
- Hussain S.M., Javorina A.K., Schrand A.M., Duhart H.M., Ali S.F., Schlager J.J. The interaction of manganese nanoparticles with PC-12 cells induces dopamine depletion. *Toxicol. Sciences.* 2006;92(2):456-463.
- Kim Y.S., Ho S.B. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: Recent insights and progress. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 2010;12(5):319-330.
- Kitson C., Angel B., Judd D., Rothery S., Severs N., Dewar A., Huang L., Wadsworth S., Cheng S., Geddes D. The extra- and intracellular barriers to lipid and adenovirus-mediated pulmonary gene transfer in native sheep airway epithelium. *Gene Therapy.* 1999;6(4):534-546.
- Matulionis D.H. Ultrastructural study of mouse olfactory epithelium following destruction by ZnSO₄ and its subsequent regeneration. *Am. J. Anat.* 1975;142(1):67-89.
- Meshulam R., Moberg P., Mahr R., Doty R. Olfaction in neurodegenerative disease: a meta-analysis of olfactory functioning in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Arch. Neurol.* 1998;55(1):84-90.
- Mikloska Z., Sanna P.P., Cunningham A.L. Neutralizing antibodies inhibit axonal spread of herpes simplex virus type 1 to epidermal cells *in vitro*. *J. Virol.* 1999;73(7):5934-5944.
- Minoshima S., Cross D. *In vivo* imaging of axonal transport using MRI: aging and Alzheimer's disease. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2008;35(1):89-92.
- Mistry A., Glud S.Z., Kjemis J., Randel J., Howard K.A., Stolnik S., Illum L. Effect of physicochemical properties on intranasal nanoparticle transit into murine olfactory epithelium. *J. Drug Targeting.* 2009;17(7):543-552.
- Moshkin M., Petrovski D., Akulov A., Romashchenko A., Gerlinskaya L., Ganimedov V., Muchnaya M., Sadovsky A., Koptyug I., Savelov A. Nasal aerodynamics protects brain and lung from inhaled dust in subterranean diggers, *Ellobius talpinus*. *Proc. R. Soc. B: Biol. Sci.* 2014;281(1792):20140919.
- Oberdorster G., Sharp Z., Atudorei V., Elder A., Gelein R., Kreyling W., Cox C. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhalation Toxicol.* 2004;16(6-7):437-445.
- Olmsted S.S., Padgett J.L., Yudin A.I., Whaley K.J., Moench T.R., Cone R.A. Diffusion of macromolecules and virus-like particles in human cervical mucus. *Biophys. J.* 2001;81(4):1930-1937.
- Pautler R.G., Koretsky A.P. Tracing odor-induced activation in the olfactory bulbs of mice using manganese-enhanced magnetic resonance imaging. *NeuroImage.* 2002;16(2):441-448.
- Royet J.P., Souchier C., Jourdan F., Ploye H. Morphometric study of the glomerular population in the mouse olfactory bulb: Numerical density and size distribution along the rostrocaudal axis. *J. Comparative Neurol.* 1988; 270(4): 559-568.
- Schellinck H.M., Rooney E., Brown R.E. Odors of individuality of germfree mice are not discriminated by rats in a habituation-dishabituation procedure. *Physiology & Behavior.* 1995;57(5):1005-1008.
- Sherry Chow H.H., Zhi C., Matsuura T. Direct transport of cocaine from the nasal cavity to the brain following intranasal cocaine administration in rats. *J. Pharmaceut. Sci.* 1999;88(8):754-758.
- Verkman A.S., Song Y., Thiagarajah J.R. Role of airway surface liquid and submucosal glands in cystic fibrosis lung disease. *Am. J. Physiology – Cell Physiology.* 2003;284(1):C2-C15.
- Wang J., Liu Y., Jiao F., Lao F., Li W., Gu Y., Li Y., Ge C., Zhou G., Li B., Zhao Y., Chai Z., Chen C. Time-dependent translocation and potential impairment on central nervous system by intranasally instilled TiO₂ nanoparticles. *Toxicology.* 2008;254(1-2):82-90.
- Wu J., Wang C., Sun J., Xue Y. Neurotoxicity of silica nanoparticles: Brain localization and dopaminergic neurons damage pathways. *ACS Nano.* 2011;5(6):4476-4489.
- Xia S., Xu S. Improved assay of coenzyme Q10 from liposomes by Tween 80 solubilisation and UV spectrophotometry. *J. Sci. Food Agr.* 2006;86(13):2119-2127.
- Yu L.E., Lanry Yung L.Y., Ong C.N., Tan Y.L., Suresh Balasubramaniam K., Hartono D., Shui G., Wenk M.R., Ong W.Y. Translocation and effects of gold nanoparticles after inhalation exposure in rats. *Nanotoxicology.* 2007;1(3):235-242.

Механизмы патогенеза трематодозов: присутствие секреторных белков кошачьей двуустки *Opisthorchis felineus* в тканях желчного пузыря у больных хроническим описторхозом

М.Ю. Пахарукова^{1, 2}✉, А.В. Ковнер¹, А.Н. Триголубов³, Е.Н. Федин³, Е.С. Михайлова^{2, 4}, С.Г. Штофин⁴, А.И. Аутеншлюс^{2, 4},
В.А. Мордвинов^{1, 2}

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

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики»,
Новосибирск, Россия

³ Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Новосибирской области «Городская клиническая больница № 2», Новосибирск, Россия

⁴ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Новосибирский
государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Россия

Описторхоз, обусловленный паразитированием кошачьей двуустки *Opisthorchis felineus* в желчных протоках печени человека и рыбоядных млекопитающих, распространен преимущественно на территории бывшего СНГ и стран Восточной Европы. Это заболевание приводит к нарушениям функций печени и поджелудочной железы: холангитам, холециститам, фиброзу печени, панкреатиту. Секреторно-экскреторный белковый продукт гельминтов считается ключевым фактором в системе взаимоотношений «паразит-хозяин» и опосредует многообразие плеiotропных патогенных эффектов влияния гельминтов на организм хозяина. Цель данной работы – определение механизма секреции паразитарных белков тиоредоксин пероксидазы и глутатион-S-трансферазы в условиях окислительного стресса *in vitro*. Методом Вестерн-блот анализа с использованием специфических антител против рекомбинантных белков описторха *O. felineus* показано, что гельминты экскретируют белки тиоредоксин пероксидазу и глутатион-S-трансферазу в среду инкубации *in vitro*. При этом моделирование окислительного стресса *in vitro* приводит к увеличению содержания белков тиоредоксин пероксидазы и глутатион-S-трансферазы в среде инкубации. С помощью иммуногистохимии продемонстрировано, что тиоредоксин пероксидаза и глутатион-S-трансфераза обнаруживаются в тканях желчных протоков экспериментальных животных (хомяков), а также людей, больных описторхозом. Полученные данные важны для понимания молекулярных механизмов патогенеза описторхоза, а также для усовершенствования методов иммунодиагностики описторхоза и ассоциированных с ним заболеваний.

Ключевые слова: описторхоз; экскреторно-секреторный продукт; активные формы кислорода; тиоредоксин пероксидаза; кошачья двуустка *Opisthorchis felineus*; иммуногистохимия; глутатион-S-трансфераза.

Mechanisms of trematodiasis pathogenicity: the presence of the secretory proteins from the liver fluke *Opisthorchis felineus* in the gallbladder tissues of the patients with chronic opisthorchiasis

M.Y. Pakharukova^{1, 2}✉, A.V. Kovner¹,
A.N. Trigolubov³, E.N. Fedin³, E.S. Mikhailova^{2, 4},
S.G. Shtofin⁴, A.I. Autenshlyus^{2, 4}, V.A. Mordvinov^{1, 2}

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

² Institute of Molecular Biology and Biophysics, Novosibirsk, Russia

³ Novosibirsk City Hospital No. 2, Novosibirsk, Russia

⁴ Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia

Opisthorchiasis caused by the liver fluke *Opisthorchis felineus* infection remains a serious public health problem in the former USSR and Eastern European countries. *O. felineus* infests the bile ducts, the liver and gallbladder of many fish-eating mammalian species, including humans. Opisthorchiasis leads to a number of related diseases of the liver and pancreas: liver fibrosis, cholangitis, cholecystitis, liver cysts and pancreatitis. Excretory-secretory products of the parasite are considered to be key factors in host-parasite relationships and mediate pathogenic pleiotropic effects on the host organism. The aim of this study was to determine the helminthic proteins (thioredoxin peroxidase and glutathione-S-transferase) in the gallbladder tissues of the experimental animals and patients with opisthorchiasis disease. We demonstrated by immunohistochemistry assay using antibodies against recombinant *O. felineus* proteins that thioredoxin peroxidase and glutathione-S-transferase could be detected in the biliary duct epithelium of the experimental animals and in human gallbladder tissues. Moreover, these proteins could also be detected in human gallbladder infiltrated cells and underlying connective tissues. The

results are important for understanding the molecular mechanisms of opisthorchiasis pathogenesis, as well as for improvement of the immunodiagnostics of the opisthorchiasis and opisthorchiasis-related diseases.

Key words: opisthorchiasis; excretory-secretory products; reactive oxygen species; thioredoxin peroxidase; liver fluke *Opisthorchis felinus*; immunohistochemistry; glutathione-S-transferase.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Пахарукова М.Ю., Ковнер А.В., Триголубов А.Н., Федин Е.Н., Михайлова Е.С., Штофин С.Г., Аутеншлюс А.И., Мордвинов В.А. Механизмы патогенеза трематодозов: присутствие секреторных белков кошачьей двуустки *Opisthorchis felinus* в тканях желчного пузыря у больных хроническим описторхозом. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(3):312-316. DOI 10.18699/VJ16.17-о

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Pakharukova M.Y., Kovner A.V., Trigolubov A.N., Fedin E.N., Mikhailova E.S., Shtofin S.G., Autenshlyus A.I., Mordvinov V.A. Mechanisms of trematodiasis pathogenicity: the presence of the secretory proteins from the liver fluke *Opisthorchis felinus* in the gallbladder tissues of the patients with chronic opisthorchiasis. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(3):312-316. DOI 10.18699/VJ16.17-о

Кошачья двуустка (*Opisthorchis felinus*), представитель паразитических плоских червей класса Трематоды семейства Opisthorchiidae, – один из возбудителей описторхоза. *O. felinus* распространен на территории стран бывшего СНГ и Восточной Европы. Описторхи паразитируют в желчных протоках человека и рыбоядных млекопитающих (Беэр, 2005; Pakharukova, Mordvinov, 2016). Описторхоз приводит к нарушениям функций печени и поджелудочной железы, вызывает дискинезии желчевыводящих путей, заболевания желудка и кишечника, вегетососудистую дистонию (Sripa et al., 2007; Ogorodova et al., 2015; Pakharukova, Mordvinov, 2016). Развитие рака желчных протоков, холангиокарциномы, напрямую связано с длительной описторхозной инвазией (Sripa et al., 2012). Родственные виды этого семейства (*O. viverrini*, *Clonorchis sinensis*) являются причиной развития холангиокарциномы и признаны Международным агентством по исследованию рака (IARC) биологическими канцерогенами человека класса I опасности (Kaewpitoon et al., 2008; IARC, 2012). В настоящее время прямой связи между описторхозом *O. felinus* у людей и заболеваемостью холангиокарциномой не показано (Pakharukova, Mordvinov, 2016). Однако канцерогенный потенциал *O. felinus* на экспериментальной модели (грызунах) в целом такой же, как у *O. viverrini* и *C. sinensis* (Maksimova et al., 2015).

Считается, что экскреторно-секреторный продукт описторха – один из ключевых компонентов его патогенного действия и во многом определяет механизм взаимодействия «паразит–хозяин». Продолжительность жизни *O. felinus* в организме человека составляет не менее 30 лет, что свидетельствует об устойчивости паразита к защитным системам организма (Беэр, 2005). По-видимому, такую защиту выполняет комплекс белковых продуктов, секретлируемых гельминтами в окружающую среду. Эти вещества совместно с физическим воздействием гельминтов могут стимулировать цитотоксические процессы в окружающих тканях, что в конечном итоге приводит к патологическим изменениям (Sripa et al., 2012).

Состав секретлируемого протеома, полученного при инкубации взрослых особей *in vitro*, описан для *O. felinus* (Львова и др., 2014) и других близкородственных трематод. Белки тиоредоксин пероксидаза (TPx) и глутатион-

S-трансфераза (GST) входят в состав этого протеома и, вероятно, выполняют функцию внешней защиты гельминтов от атаки кислородных радикалов при столкновении с эозинофилами и нейтрофилами (Suttiaprapa et al., 2008; Dalton et al., 2013; Львова и др., 2014). Кроме того, TPx модулирует развитие иммунного ответа, осуществляя активацию макрофагов по альтернативному пути, направленному на снижение воспалительных процессов и усиление репаративных процессов (Dalton et al., 2013). Эти белки у млекопитающих участвуют во внутриклеточной защите клеток от кислородных радикалов.

Необходимо отметить, что до сих пор не известно, есть ли различия между секреторными белками, полученными при инкубации описторхов *in vitro* в неблагоприятных для гельминтов условиях инкубации, и *in vivo* внутри желчных протоков млекопитающих. Такие различия могут быть обусловлены тем, что оболочка трематод обладает способностью частично слущиваться в среду инкубации при неблагоприятных условиях. При этом несовершенство методов поддержания трематод *in vitro* может объяснять наличие в среде инкубации цитоплазматических ферментов TPx и GST. Таким образом, до сих пор нет прямых доказательств, что эти белки действительно секретируются гельминтами *in vivo*. Кроме того, спектр секреторных белков червей, полученных на модели грызунов, – не показатель того, что происходит при описторхозе человека. Цель данной работы – определение белков TPx и GST описторха в тканях желчных протоков и желчного пузыря экспериментальных животных, а также желчного пузыря человека.

Материалы и методы

Биоматериал. Метацеркарии *Opisthorchis felinus* были выделены из подкожных мышечных тканей зараженных рыб (язь) из р. Обь (Pakharukova et al., 2015). Шесть-восемь недельных хомяков *Mesocricetus auratus* подвергали заражению перорально 50 метацеркариями. Протокол экспериментальных работ с хомяками был одобрен Комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН (Протокол № 25 от 12.12.2014). Образцы биоматериала человека – ткани желчного пузыря – получены от пациентов с холециститом и холелитиазом при выполнении лапароскопической

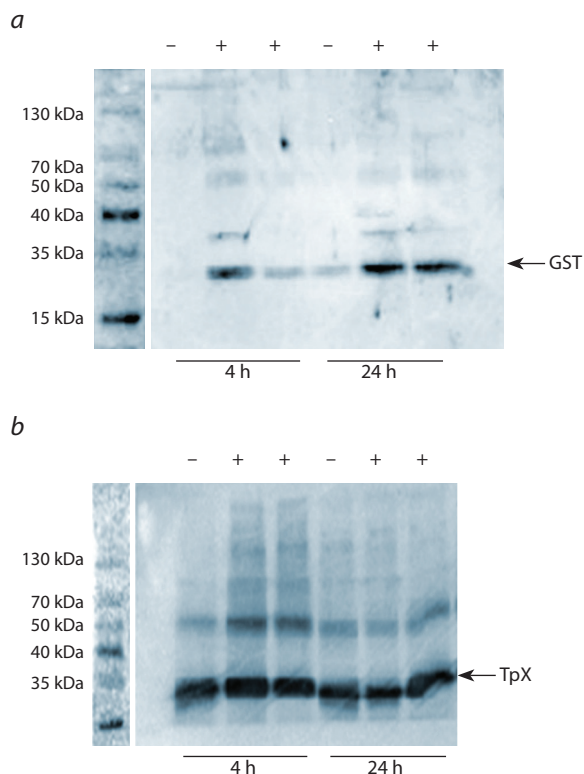


Fig. 1. Contents of (a) GST and (b) TPx proteins in (–) *in vitro* worm incubation medium and (+) after hydrogen peroxide treatment for 4 and 24 hours.

One typical result is shown for each case. The arrows indicate proteins (a) GST and (b) TPx.

операции по удалению желчного пузыря в Городской клинической больнице № 2 г. Новосибирска. Материал от пациентов с описторхозом отбирали в опытную группу (2 человека), материал от пациентов без описторхоза (30 человек) – в контрольную. Протокол исследования с использованием материала пациентов был одобрен этической комиссией НИИ молекулярной биологии и биофизики, г. Новосибирск (Протокол № 2/2016 от 27.10.2016).

Иммуногистохимия. Образцы печени трех контрольных и трех зараженных описторхами хомяков фиксировали в забуференном 10 % формалине в течение одного-семи дней при 4 °С, затем образцы обезжизивали в серии возрастающего градиента этилового спирта и ксилола, заключали в синтетическую парафиновую смесь. Таким же способом подготавливали образцы стенки желчного пузыря человека. Срезы толщиной 4 мкм изготавливали на ротационном микротоме (Microm, Германия), окрашивали гематоксилином и эозином или проводили иммуногистохимию (Kovner et al., 2016) с ранее полученными первичными антителами против рекомбинантного белка *O. felineus* TPx (разведение 1:100) (Петренко и др., 2016) или первичными антителами против рекомбинантного белка *O. felineus* GST 28 кДа (разведение 1:20) (Разумов и др., 2016), далее обрабатывали вторичными антителами, мечеными HRP (Abcam, США). Анализ готовых препаратов проводили с помощью светового микроскопа AxioImager A1 с фотокамерой AxioCam MRc (Carl Zeiss, Германия).

Культивирование червей *in vitro* и Вестерн-блот анализ. Взрослых червей *O. felineus* выделяли из желчных протоков печени хомяков через 3–4 мес. после заражения, промывали более 10 раз в физиологическом растворе (0.9 % р-р NaCl), затем несколько раз в среде RPMI-1640, содержащей 1 % глюкозы, 100 мкг/мл стрептомицина, 100 мкг/мл пенициллина, 0.25 мкг/мл амфотерицина В (Sigma, США), и инкубировали в течение одного дня в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °С (Pakharukova et al., 2015). Через один день для моделирования окислительного стресса в среду добавляли 0.5 мМ перекись водорода. Из лунок отбирали 200 мкл среды через 4 и 24 ч в образцы добавили протеазный ингибиторный коктейль (Amresco) и хранили при –80 °С. Эксперименты были повторены три раза. Вестерн-блот анализ проводили с помощью стандартной методики, используя ранее полученные антитела против TPx (разведение 1:1000) (Петренко и др., 2016) или GST 28 кДа (разведение 1:500) (Разумов и др., 2016) и стандартное количество среды культивирования – 30 мкл.

Результаты

Содержание TPx в среде инкубации взрослых червей анализировали с помощью метода Вестерн-блот (рис. 1) через 4 и 24 ч от начала эксперимента. Обнаружено, что в течение времени инкубации гельминтов в среде наблюдается увеличение интенсивности сигналов белков GST, что свидетельствует о накоплении этих белков в окружающей среде (см. рис. 1), белок TPx через 4 ч присутствует в среде инкубации в большом количестве. Таким образом, гельминты экскретируют белки TPx и GST, которые находятся в среде инкубации. Интересно, что воздействие перекисью водорода вызывает увеличение интенсивности сигналов белков TPx и GST по сравнению с контролем. Таким образом, моделирование окислительного стресса *in vitro* приводит к увеличению содержания белков TPx и GST описторха в среде инкубации (см. рис. 1).

Для изучения способности червей экскретировать белки TPx и GST в желчных протоках проведены иммуногистохимические исследования образцов печени контрольных и зараженных описторхами хомяков (рис. 2) с антителами, полученными на рекомбинантные белки *O. felineus* TPx и GST.

На рис. 2, б в протоке желчного пузыря виден описторх (О), внутри описторха – яйца. Ткани описторха почти полностью прокрашиваются антителами против TPx. У инфицированных животных белки TPx и GST обнаружены в клетках стенки желчных протоков – холангиоцитах; в клетках желчных протоков контрольных животных реакция на антитела не наблюдается (см. рис. 2, а). Таким образом, паразитические белки TPx и GST попадают наружу и выявляются в клетках эпителия желчных протоков экспериментальных животных.

Результаты исследований с использованием образцов желчного пузыря пациентов, страдающих описторхозом, показали, что эти белки также могут присутствовать в клетках эпителия желчного пузыря человека (рис. 3). Кроме холангиоцитов, при использовании антител к белкам TPx и GST специфическим образом окрашиваются также клетки инфильтрата и подлежащей соединительной ткани.

Обсуждение

В работе впервые показано, что в составе секретируемого протеома описторха *O. felineus* при паразитировании на человеке находятся белки TPx и GST. Важно подчеркнуть, что эти белки накапливаются в тканях желчных протоков и, вероятно, могут участвовать в механизмах взаимоотношений «паразит–хозяин».

Роль паразитарных белков TPx и GST в развитии описторхоз-ассоциированных заболеваний TPx и GST в настоящее время исследована только фрагментарно. Имеющиеся в литературе данные о значении паразитарных белков во взаимоотношениях «паразит–хозяин» при гельминтных трематодных заболеваниях в подавляющем большинстве получены в результате исследований шистосомозов (паразитарных заболеваний, вызываемых трематодами рода *Schistosoma*) и в меньшей степени – трематодозов гепато-билиарной системы, к которым относятся, в частности, описторхоз, вызываемый *O. viverrini*, и клонорхоз, обусловленный *C. sinensis*, а также фасциолез, вызываемый *Fasciola hepatica*. По сравнению с работами, посвященными этим гельминтозам, молекулярные исследования описторхоза, вызываемого *O. felineus*, находятся на начальной стадии. Известно, что тиоредоксин пероксидаза *F. hepatica* обладает иммуномодулирующими свойствами в организме хозяина – снижает уровень TH1-ответа и усиливает степень TH2-ответа иммунной системы (Dalton et al., 2013), направленный на снижение воспалительных процессов, усиление заживления ран. Кроме того, показано, что секретируемая *O. viverrini* глутатион-S-трансфераза способна регулировать пролиферацию клеток, действуя как митоген, через активацию AKT и ERK путей передачи сигнала (Daorueang et al., 2012). Учитывая тот факт, что хронический описторхоз приводит к ряду серьезных осложнений, в частности к холангиофиброзу, а также холангиокарциноме (Sripa et al., 2007; Maksimova et al., 2015), белки TPx и GST, накапливающиеся в холангиоцитах длительное время, играют, вероятно, важную роль в патогенезе заболевания и возникновении его осложнений (Sripa et al., 2012). Таким образом, полу-

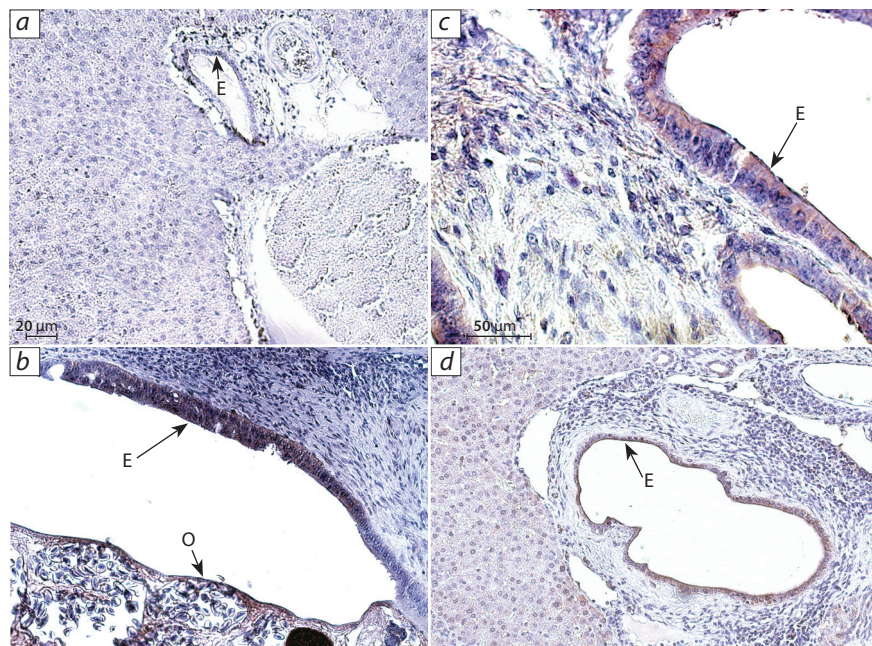


Fig. 2. Immunohistochemical staining of liver samples from (a) control animals and (b, c, d) from animals infected with *O. felineus* three months before the analysis. The staining was done with antibodies against *O. felineus* proteins: (a, b, d) TPx and (c) GST. One typical result is shown for each case.

E, bile duct epithelium; O, worm inside the bile duct. a, d: $\times 100$; b, c: $\times 400$

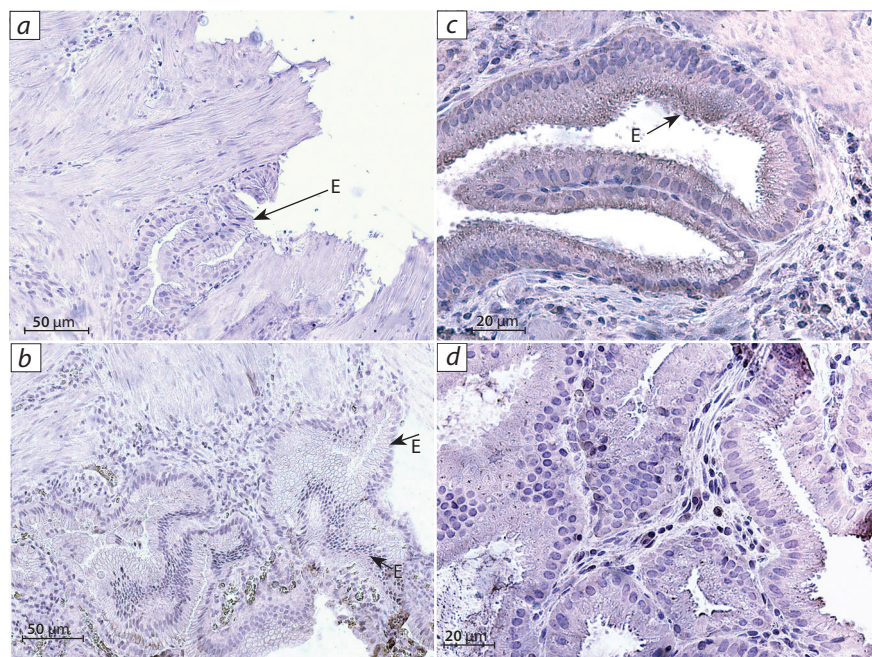


Fig. 3. Bile duct samples (a, b: $\times 100$; c, d: $\times 400$) from (a, b) uninfected people and (c, d) people infected with *O. felineus* after immunohistochemistry with antibodies against *O. felineus* proteins (a, c) TPx or (b, d) GST. One typical result is shown for each case.

E, bile duct epithelium.

ченные результаты имеют важное значение для развития представлений о механизмах патогенеза описторхоза, вызванного *O. felinus*, и описторхоз-ассоциированных заболеваний человека.

Важно отметить, что, по результатам нашего исследования, белки TPx и GST *O. felinus* обладают выраженной иммуногенностью при обнаружении в тканях человека. Вероятно, есть возможность нахождения этих белков в биологических жидкостях пациентов с описторхозом, в частности в крови и желчи. К сожалению, в настоящее время диагностика описторхоза методом иммуноферментного анализа не всегда дает гарантированный результат. Часто результат диагностики ложноотрицательный (Собств. неопубл. данные). Это может быть вызвано как относительно слабой степенью инвазии пациента описторхом, так и недостаточной эффективностью анти-тел в коммерчески доступных наборах для выявления описторхоза. На основании полученных результатов можно предположить, что использование антител против секреторных белков TPx и GST *O. felinus* улучшит методы иммунодиагностики описторхоза и ассоциированных с ним заболеваний.

Acknowledgments

This study was supported by the Russian Foundation for Basic Research, projects 16-04-00356a, 15-04-03551a, and State Budgeted Project 0324-2016-0002.

The authors are grateful to colleagues from the Institute of Cytology and Genetics V. Petrenko and M. Pomaznyy for kindly provided antibodies against *O. felinus* proteins TPx and GST and to participants of the Tomsk OPIsthorchiasis Consortium (TOPIC) (Ogorodova et al., 2015).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Beer S.A. *Biologiya vozbuditelya opistorkhoza* [Biology of the agent of opisthorchiasis]. Moscow: KMK Publ., 2005;336 p. (in Russian)
- Dalton J.P., Robinson M.W., Mulcahy G., O'Neill S.M., Donnelly S. Immunomodulatory molecules of *Fasciola hepatica*: candidates for both vaccine and immunotherapeutic development. *Vet. Parasitol.* 2013;195(3-4):272-285. DOI 10.1016/j.vetpar.2013.04.008.
- Daorueang D., Thuwajit P., Roittrakul S., Laha T., Kaewkes S., Endo Y., Thuwajit C. Secreted *Opisthorchis viverrini* glutathione S-transferase regulates cell proliferation through AKT and ERK pathways in cholangiocarcinoma. *Parasitol. Int.* 2012;61(1):155-161. DOI 10.1016/j.parint.2011.07.011. Epub. 2011. Jul. 19.
- IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. 2012;100(Pt. B):1-441.
- Kaewpitoon N., Kaewpitoon S.J., Pengsaa P., Sripa B. *Opisthorchis viverrini*: the carcinogenic human liver fluke. *World J. Gastroenterol.* 2008;14:666-674. DOI 10.3748/wjg.14.666.
- Kovner A.V., Potapova O.V., Shkurupy V.A., Shestopalov A.M. Morphofunctional characteristics of pulmonary surfactant system and its effect on immune cells in Influenza A (H1N1) Pathogenesis. *Open J. Pathol.* 2016;06(1(01)):1-7. DOI 10.4236/ojpathology.2016.61001.
- L'vova M.N., Duzhak T.G., Tsentelovich Iu.P., Katokhin A.V., Mordvinov V.A. Secretome of the adult liver fluke *Opisthorchis felinus*. *Parazitologiya = Parasitology.* 2014;48(3):169-184. (in Russian)
- Maksimova G.A., Pakharukova M.Y., Kashina E.V., Zhukova N.A., Kovner A.V., Lvova M.N., Katokhin A.V., Tolstikova T.G., Sripa B., Mordvinov V.A. Effect of *Opisthorchis felinus* infection and dimethylnitrosamine administration on the induction of cholangiocarcinoma in Syrian hamsters. *Parasitol. Int.* 2015. Oct. 6. pii: S1383-5769(15)00166-X. DOI 10.1016/j.parint.2015.10.002.
- Ogorodova L.M., Fedorova O.S., Sripa B., Mordvinov V.A., Katokhin A.V., Keiser J., Odermatt P., Brindley P.J., Mayboroda O.A., Velavan T.P., Freidin M.B., Sazonov A.E., Saltykova I.V., Pakharukova M.Y., Kovshirina Y.V., Kaloulis K., Krylova O.Y., Yazdanbakhsh M. Opisthorchiasis: an overlooked danger. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015. 9:e0003563. DOI 10.1371/journal.pntd.0003563.
- Pakharukova M.Y., Mordvinov V.A. The liver fluke *Opisthorchis felinus*: biology, epidemiology, and carcinogenic potential. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2016;110:28-36. DOI 10.1093/trstmh/trv085.
- Pakharukova M.Y., Shilov A.G., Pirozhkova D.S., Katokhin A.V., Mordvinov V.A. The first comprehensive study of praziquantel effects *in vivo* and *in vitro* on European liver fluke *Opisthorchis felinus* (Trematoda). *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2015;46(1):94-100. DOI 10.1016/j.ijantimicag.2015.02.012.
- Petrenko V.A., Pakharukova M.Y., Kovner A.V., Lvova M.N., Lyakhovich V.V., Mordvinov V.A. Mechanisms of thioredoxin peroxidase secretion by the liver fluke *Opisthorchis felinus* in the animal model of opisthorchiasis. *Byull. eksperim. biol. i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2016;12:743-747. (in Russian)
- Razumov I.A., Pomaznyy M.Y., Belavin P.A., Ponomareva E.P., Mordvinov V.A. Cloning of 28 kDa glutathione-S-transferase of the trematode *Opisthorchis felinus* and estimation of the antigenic properties of the recombinant protein. *Parazitologiya = Parasitology.* 2016;50(1):82-91. (in Russian)
- Sripa B., Brindley P.J., Mulvanna J., Laha T., Smout M.J., Mairiang E., Bethony J.M., Loukas A. The tumorigenic liver fluke *Opisthorchis viverrini* multiple pathways to cancer. *Trends Parasitol.* 2012; 28(10):395-407. DOI 10.1016/j.pt.2012.07.006.
- Sripa B., Kaewkes S., Sithithaworn P., Mairiang E., Laha T., Smout M., Regional C.M. Liver fluke induces cholangiocarcinoma. *PLoS Med.* 2007;4(7):e201.
- Suttiaprapa S., Loukas A., Laha T., Wongkham S., Kaewkes S., Gaze S., Brindley P.J., Sripa B. Characterization of the antioxidant enzyme, thioredoxin peroxidase, from the carcinogenic human liver fluke, *Opisthorchis viverrini*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2008;160:116-122. DOI 10.1016/j.molbiopara.2008.04.010.



Кандидатные антиревматические плазмидные конструкции обладают низкой иммуногенностью

Т.С. Непомнящих, Т.В. Трегубчак, С.Н. Якубический, О.С. Таранов, Р.А. Максюттов, С.Н. Щелкунов

Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Новосибирская область, Россия

Ревматоидный артрит (РА) – тяжелое системное заболевание соединительной ткани с преимущественным поражением суставов по типу хронического прогрессирующего эрозивно-деструктивного полиартрита и внесуставными проявлениями. При РА разрушаются хрящевые поверхности суставов, наблюдаются дегенеративные изменения подхрящевой костной ткани, нарушается подвижность суставов, происходит их деформация. РА страдает около 1 % человеческой популяции. Эффективный способ лечения РА – биологическая терапия с помощью рекомбинантных белков-антагонистов воспалительных цитокинов. Наиболее широко в клинической практике используют ингибиторы фактора некроза опухолей (TNF – tumor necrosis factor) – рекомбинантные TNF-рецепторы и антитела к TNF. Однако эти методы лечения не лишены побочных эффектов. Отмечается повышенная восприимчивость пациентов к инфекционным заболеваниям, увеличивается риск развития онкологических и аутоиммунных патологий. Кроме того, часто происходит снижение эффективности лечения из-за развития иммунного ответа на терапевтический белок. Побочные эффекты связаны с регулярным системным введением больших доз рекомбинантного белка, одним из способов решения этой проблемы может стать генная терапия. Основой новых генотерапевтических препаратов для лечения РА и других заболеваний человека могут стать гены различных вирусов, кодирующие разные иммуномодулирующие белки. Поксвирусы обладают беспрецедентным по сравнению с вирусами других семейств набором генов, продукты которых эффективно модулируют защитные функции организма хозяина. В частности, в геномах ортопоксвирусов есть гены, кодирующие TNF-связывающие белки. Ранее в различных лабораторных моделях было показано, что рекомбинантный TNF-связывающий белок CrmB является эффективным блокатором TNF. Эффективность лечения может снижаться из-за развития иммунного ответа на терапевтический белок, поэтому такие препараты должны обладать низкой иммуногенностью. В настоящей работе показано, что кандидатные антиревматические генотерапевтические плазмидные конструкции, кодирующие поксвирусный TNF-связывающий белок, обладают гораздо меньшей иммуногенностью по сравнению с белковыми препаратами.

Ключевые слова: ревматоидный артрит; иммуногенность; генотерапия; ортопоксвирусный TNF-связывающий белок.

Candidate antirheumatic genotherapeutic plasmid constructions have low immunogenicity

T.S. Nepomnyashchikh, T.V. Tregubchak, S.N. Yakubitskiy, O.S. Taranov, R.A. Maksyutov, S.N. Shchelkunov

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

Rheumatoid arthritis (RA) is a serious systemic disease of connective tissue, mainly affecting joints but also with different extra-articular manifestations. In the course of RA the degenerative changes occur in cartilage surfaces of affected joints and also in subchondral bone tissue, joints get deformed and lose their mobility. RA affects about 1 % of the global human population. Biological therapy with recombinant protein inhibitors of inflammatory cytokines is an effective and well-accepted treatment of RA. TNF inhibitors such as recombinant receptors or monoclonal antibodies are the most widely used biotherapeutics in clinical practice. However, this treatment has some serious side effects. The patients treated with TNF inhibitors are more susceptible to infection diseases, they are also at higher risk of developing neoplastic or autoimmune disorders. Biotherapeutics become less effective or even lose their efficiency with evoking specific antidrug antibodies. These drawbacks are in general associated with repeated systemic injections of large amounts of recombinant protein required to achieve the therapeutic efficacy. Genetic therapy might provide a good and effective solution. Viral genes coding for immunomodulatory factors could be used to create new gene therapy products to treat RA and other human disease. Poxviruses, as compared to other viral families, have an unprecedentedly rich set of such immunomodulatory genes. In particular, they have genes encoding TNF-binding proteins. Previously in a variety of laboratory models we have shown that recombinant TNF-binding protein CrmB can effectively block TNF. In this work we demonstrated that candidate antirheumatic genotherapeutic plasmid constructions encoding poxviral TNF-binding proteins have low immunogenicity.

Key words: rheumatoid arthritis; immunogenicity; gene therapy; orthopoxviral TNF-binding protein.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Непомнящих Т.С., Трегубчак Т.В., Якубический С.Н., Таранов О.С., Максюттов Р.А., Щелкунов С.Н. Кандидатные антиревматические плазмидные конструкции обладают низкой иммуногенностью. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(3):317-322. DOI 10.18699/VJ17.249

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Nepomnyashchikh T.S., Tregubchak T.V., Yakubitskiy S.N., Taranov O.S., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. Candidate antirheumatic genotherapeutic plasmid constructions have low immunogenicity. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(3):317-322. DOI 10.18699/VJ17.249

Ревматоидный артрит (РА) – системное аутоиммунное заболевание соединительной ткани с преимущественным поражением суставов по типу хронического прогрессирующего эрозивно-деструктивного полиартрита и внесуставными проявлениями. РА страдает около 1 % человеческой популяции. При отсутствии лечения (неоптимальном лечении) разрушаются хрящевые поверхности суставов, отмечаются дегенеративные изменения подхрящевой костной ткани – нарушается подвижность суставов, происходит их деформация (Brasington et al., 2010).

При терапии РА основными мишенями являются воспалительные цитокины, и прежде всего фактор некроза опухолей (TNF), один из основных медиаторов этого заболевания. Наиболее распространенная и эффективная стратегия биологической терапии – использование препаратов на основе антител к TNF (адалимумаб, инфликсимаб) или растворимого TNF-рецептора (этанерцепт) (Venkatesha et al., 2015). Однако биологическая терапия имеет ряд недостатков: повышается восприимчивость пациентов к инфекционным заболеваниям, увеличивается риск развития онкологических и аутоиммунных патологий (Lee et al., 2010; Sfrikakis, Tsokos, 2011), требуется многократное системное введение больших доз рекомбинантного белка (Lee et al., 2010; Evans et al., 2013; Drutskaya et al., 2014). Поэтому в настоящее время актуальна разработка методов генной терапии, основанной на введении терапевтических генов. Один из способов доставки – введение плазмид, содержащих гены, кодирующие иммуномодулирующие белки (Li, Huang, 2006; Непомнящих и др., 2016).

Вирусы в процессе своей эволюции выработали различные стратегии преодоления защитных реакций организма хозяина. Поксвирусы обладают беспрецедентным, по сравнению с вирусами других семейств, набором генов, продукты которых эффективно модулируют многочисленные защитные функции организма хозяина (Shchelkunov, 2012; Shchelkunova, Shchelkunov, 2016). В частности, ортопоксвирусы детерминируют синтез белка CrmB, состоящего из двух доменов: N-концевого, связывающего TNF, и C-концевого, связывающего хемокины. В различных лабораторных моделях показано, что рекомбинантный белок CrmB (47 кДа) можно использовать в качестве эффективного блокатора TNF (Гилева и др., 2006; Gileva et al., 2006, 2015; Цырендоржиев и др., 2013, 2014). Однако препараты для терапии заболеваний должны обладать низкой иммуногенностью, поскольку выявлено, что эффективность лечения может снижаться из-за развития иммунного ответа на терапевтический белок (Krieckaert et al., 2012; Bendtzen et al., 2015; Chen et al., 2015; Eng et al., 2015). Показано, что синтезированный в бактериальных клетках укороченный TNF-BD (17 кДа) эффективно связывается с человеческим TNF и обладает меньшей по сравнению с CrmB иммуногенностью при многократном введении лабораторным животным (Трегубчак и др., 2015).

Целью данной работы было изучение индукции иммунного ответа при внутримышечном введении плазмид pcDNA-CrmB или pcDNA/sTNF-BD, кодирующих полноразмерный TNF-связывающий белок CrmB вируса

натуральной оспы (variola virus, VARV) или его укороченный вариант, содержащий только N-концевой TNF-рецепторный домен, по сравнению с введением препаратов соответствующих рекомбинантных белков.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы и культуры клеток. Штамм *E. coli* XL2Blue, линии клеток почки африканской зеленой мартышки CV-1 и мышинных фибробластов L929 получены из коллекции культур микроорганизмов и культур клеток ГНЦ ВБ «Вектор». Линию клеток CV-1 культивировали в среде DMEM («БиолоТ», Россия) с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки коров («БиолоТ», Россия). Для культуральных работ использовали шестилучные планшеты фирмы Orange Scientific (США).

Рекомбинантные белки. В работе использовали белок CrmB VARV, выделенный с помощью аффинной хроматографии из культуральной среды клеток Sf-21, зараженных рекомбинантным бакуловирусом (Лебедев и др., 2001); TNF-BD (Трегубчак и др., 2015) и вирионный белок A30 VARV (Разумов и др., 2005), синтезированные в клетках *E. coli* и выделенные с использованием Ni-NTA агарозы согласно рекомендациям фирмы-изготовителя (QIAGEN, Германия). Качество очистки белков определяли с помощью электрофореза в ПААГ. Концентрацию белков определяли по методу Брэдфорда (Bradford, 1976). Для полученных препаратов рекомбинантных белков CrmB и TNF-BD подтверждена их способность нейтрализовать цитотоксическое действие TNF человека и мыши на культуре клеток L929, как описано в (Gileva et al., 2006).

Рекомбинантные плазмиды. Рекомбинантные плазмиды pcDNA/CrmB, pcDNA/sTNF-BD и pcDNA/GFP получали встраиванием последовательностей ДНК, кодирующих белки CrmB, TNF-BD или GFP, в плазмиду pcDNA3.1. Структуру созданных плазмид подтверждали секвенированием.

Полученными рекомбинантными плазмидами или векторной плазмидой pcDNA3.1 трансформировали компетентные клетки *E. coli* штамма XL2Blue и культивировали при эффективной аэрации и температуре 37 °C, 15 ч. Очистку рекомбинантных плазмидных ДНК из полученных культур производили при помощи набора EndoFree Plasmid Giga Kit фирмы QIAGEN (Германия) в соответствии с рекомендациями производителя.

Животные. В экспериментах использовали мышей линии BALB/c, самок, возраст 6 нед, массой 16–18 г, полученных из вивария ГНЦ ВБ «Вектор». Их содержали при естественном световом режиме и постоянном доступе к воде и пище. Животных содержали и выводили из эксперимента в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите животных, используемых для экспериментальных целей (Страсбург, 1968).

Трансфекция культуры клеток CV-1. Клетки линии CV-1 культивировали, как описано выше, до формирования клеточного монослоя на 80–85 % поверхности лунки. Смешивали 2 мкг плазмиды pcDNA/GFP с 15 мкл липофектамина (Invitrogen, США) в концентрации 1 мг/мл, добавляли 1 мл среды DMEM и оставляли на 15 мин при комнатной температуре, затем наносили на монослой клеток, предварительно дважды промытый средой DMEM

без сыворотки. Через 5 ч удаляли среду, клетки заливали средой DMEM с 2 % эмбриональной сыворотки коров и инкубировали при 37 °C в течение 48 ч. В качестве контроля использовали нетрансфицированные клетки. Продукцию GFP анализировали в клетках CV-1 путем визуализации в проходящем ультрафиолетовом свете.

Микроскопическое исследование проводили с помощью исследовательского микроскопа AxioImager A1 (ZEISS, Германия), оснащенного цифровой камерой высокого разрешения HRC, флуоресцентным блоком и системой анализа изображения AxioVision Rel. 4.8.2., включая модуль многоканальной флуоресценции Multi-dimensional Acquisition. Использовали набор фильтров: EXBR 450-490, BSFT 510, EMLP 515. Объективы EC Plan Neofluar: $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$.

Иммунизация животных. Полученными препаратами рекомбинантных плазмид или белков иммунизировали мышей. Животные были разбиты на шесть групп по типу вводимого препарата: первой группе (контрольной) вводили плазмидную ДНК pcDNA3.1; второй – pcDNA/sTNF-BD; третьей – pcDNA/CrmB; четвертой – белок A30; пятой – белок TNF-BD; шестой – белок VARV-CrmB. Использовано по шесть животных на группу. Перед иммунизацией проводили контрольный забор крови из ретроорбитального синуса. Количество препарата для белков брали из расчета 5 мкг/мышь, плазмидной ДНК – 100 мкг/мышь. Препараты в объеме 100 мкл вводили внутримышечно в правую заднюю лапу. Иммунизацию проводили с интервалом 14 сут. Всего проведено четыре последовательные иммунизации.

Через 12 сут после каждой иммунизации забирали кровь из ретроорбитального синуса у шести животных из каждой группы и отделяли сыворотку.

Иммуноферментный анализ (ИФА) концентрации антител против рекомбинантных вирусных белков проводили в 96-луночных планшетах (Costar). Белки VARV-CrmB, TNF-BD или A30 с концентрацией 1 мкг/мл сорбировали на дно лунок при температуре 4 °C в течение 16 ч. Далее планшет промывали три раза буфером PBS в сочетании с Твин 20 (PBST). В каждую лунку вносили по 100 мкл 0.5 % БСА в PBST, инкубировали при комнатной температуре 2 ч. Содержимое лунок удаляли, затем наносили по 100 мкл двукратных разведений полученных сывороток (от 1 : 2 до 1 : 256) в PBST, содержащем 0.5 % БСА, и инкубировали при температуре 37 °C в течение одного часа. Анализировали смесь иммунной сыворотки, полученной от шести животных каждой группы. Далее жидкость из лунок удаляли и лунки три раза промывали PBST. Затем в лунки вносили по 100 мкл конъюгата пероксидазы хрена с антителами козы против иммуноглобулинов мыши (разведение 1 : 5000, Bio-Rad), разбавленного 0.5 % БСА в PBST, и инкубировали при температуре 37 °C в течение одного часа. Затем жидкость из лунок удаляли, лунки три раза промывали буфером PBST, добавляли в каждую лунку по 100 мкл проявляющего раствора и инкубировали в темноте при комнатной температуре 30 мин. Реакцию останавливали добавлением в каждую лунку по 100 мкл 1 н HCl. Интенсивность окрашивания определяли, измеряя оптическую плотность при длине волны 495 нм. В качестве контроля неспецифического связывания ис-

пользовали лунки, в которых вместо изучаемых белков был сорбирован БСА.

Статистический анализ. Сравнение групп проводили с помощью двустороннего *t*-теста Стьюдента для зависимых (сравнение сывороток одной группы животных при сорбции разных белков) или независимых выборок (сравнение сывороток, полученных от животных из различных групп). Коррекцию на множественное тестирование проводили по методу Бенъямини–Хохберга (FDR-коррекция). Достоверными считались отличия при скорректированном значении $p < 0.05$.

Результаты

Анализ синтеза белка GFP, направляемого плазмидой pcDNA-GFP, *in vitro* и *in vivo*. Для подтверждения возможности продукции рекомбинантных белков, гены которых встроены в вектор pcDNA3.1, проводили трансфекцию клеток линии CV-1 плазмидой pcDNA/GFP, как указано в разделе Материалы и методы. Продукция GFP была показана в клетках CV-1 путем визуализации в проходящем ультрафиолетовом свете.

Далее определяли экспрессию гена белка GFP в векторе pcDNA3.1 *in vivo*. Для этого сформировали две группы по шесть животных. Мышам первой группы вводили внутримышечно в дозе 100 мкг/мышь плазмиду pcDNA/GFP; второй (контрольной) группы – плазмиду pcDNA3.1. Через 3 и 7 сут после инъекции трех животных из каждой группы выводили из эксперимента, изготавливали нативные препараты мышц бедра (место введения), которые анализировали с помощью люминесцентного микроскопа.

Через 3 сут обнаруживалась узкая полоска характерного для GFP зеленого свечения по ходу раневого канала (рис. 1, а). Через 7 сут после инъекции плазмиды pcDNA/GFP зона зеленого свечения распространялась на значительное расстояние от места инъекции (рис. 1, б). У мышей контрольной группы свечение не обнаружено.

Анализ иммуногенности рекомбинантных плазмид и белков. Иммунизировали мышей препаратами векторной плазмиды pcDNA3.1, рекомбинантных плазмид pcDNA/sTNF-BD, pcDNA/CrmB, рекомбинантных белков A30, TNF-BD или VARV-CrmB. Количество специфических антител в полученных сыворотках определяли с помощью ИФА. Анализировали смесь иммунной сыворотки, полученной от шести животных каждой группы.

После первой и второй иммунизации не было достоверного отличия концентрации антител к целевым белкам по сравнению с контрольными сыворотками, полученными до иммунизации.

После третьей иммунизации специфический иммунный ответ был выявлен только для мышей, которым вводили рекомбинантный белок CrmB (рис. 2, а). После четвертой иммунизации концентрация антител на белок CrmB увеличилась (см. рис. 2, б). Кроме того, менее выраженный специфичный иммунный ответ обнаружен после четвертой иммунизации у мышей, иммунизированных рекомбинантными белками A30 и TNF-BD (см. рис. 2, б). Для остальных групп мышей не показано достоверное отличие концентраций антител к целевым белкам по сравнению с контролем.

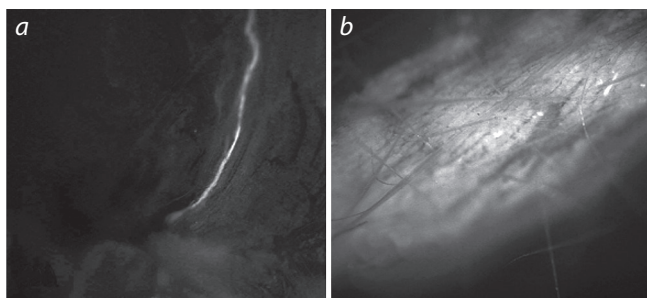


Fig. 1. Fluorescence microscopy of a native quadriceps muscle preparation.
GFP expression in muscle tissue on (a) day 3 and (b) day 7 after injection of plasmid pcDNA-GFP (200 × magnification).

Обсуждение

Цитокины – ключевые модуляторы воспалительных и иммунных реакций – играют центральную роль в развитии воспалительных и аутоиммунных заболеваний, в том числе ревматоидного артрита. Одним из основных медиаторов патогенеза этих заболеваний является TNF (Непомнящих и др., 2016). В настоящее время биологическая терапия с помощью антагонистов TNF успешно используется для лечения ревматоидного артрита, в том числе и в виде монотерапии (Karampetsou et al., 2010).

Несмотря на высокую эффективность биологической терапии, в последнее время все больше исследователей задаются вопросами ее безопасности. У пациентов, принимающих анти-TNF препараты, возрастает риск развития серьезных легочных и кожных инфекций; иногда наблюдаются различные аутоиммунные заболевания, отмечается более высокая частота лимфом (Lee et al., 2010; Sfrikakis, Tsokos, 2011). Побочные эффекты терапии белковыми антагонистами цитокинов обусловлены в значительной степени ее системным характером. Для достижения лечебного эффекта требуются большие дозы терапевтического белка, необходимы повторные инъекции (Lee et al., 2010; Evans et al., 2013; Drutskaia et al., 2014).

Кроме того, отмечено образование антител против биотерапевтических молекул. На примере адалимумаба и этанерцепта при лечении ревматоидного артрита показано, что уровень таких антител обратно коррелирует с эффективностью терапии и уровнем биотерапевтических молекул в сыворотке пациентов (Krieckaert et al., 2012; Chen et al., 2015). Показано, что в присутствии специфических антител инфликсимаб слабо детектируется в сыворотке пациентов (Eng et al., 2015). Несмотря на то что ненейтрализующие антитела не связываются с активным сайтом биотерапевтической молекулы и не препятствуют ее связыванию с лигандом, они могут способствовать ее эндоцитозу и деградации, снижая, таким образом, эффективность терапии (Bendtsen et al., 2015). Кроме того, отмечены случаи и серьезных аллергических реакций (Schellekens, 2002; Shankar et al., 2007; Vincent et al., 2013). Нейтрализующие антитела могут реагировать и с эндогенными белками, приводя к развитию системных патологий (Li et al., 2001; Casadevall et al., 2002). Таким образом, нежелательная иммуногенность может стать серьезным

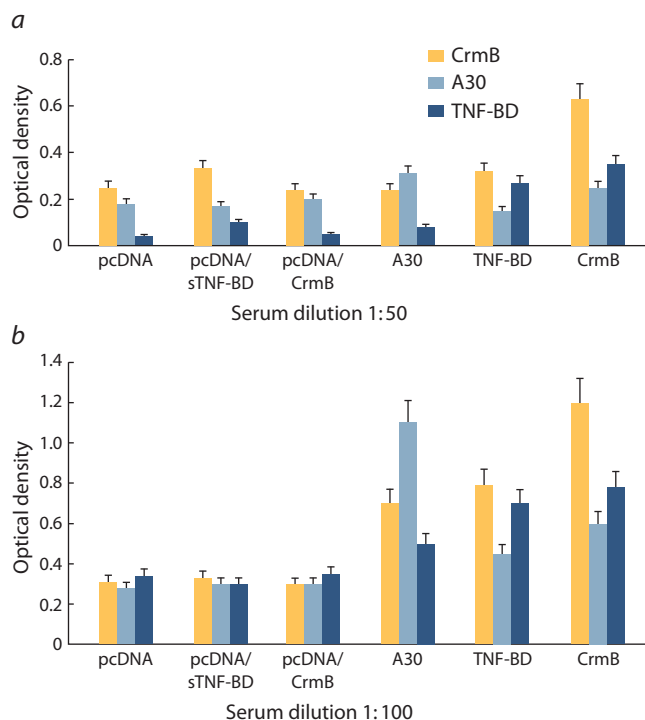


Fig. 2. ELISA of sera obtained from mice immunized with preparations of either recombinant proteins or plasmids encoding the same proteins.

X-axis, data for sera from different immunization groups. Labels show immunogens used: pcDNA, immunization with intact vector plasmid (negative control); pcDNA/sTNF-BD, immunization with plasmid encoding the TNF-binding domain of VARV CrmB protein; pcDNA/CrmB, with plasmid encoding the whole VARV CrmB protein; A30, immunization with highly immunogenic recombinant VARV A30 envelope protein (positive control); TNF-BD, immunization with recombinant TNF-binding domain of VARV-CrmB; CrmB, immunization with recombinant full-length VARV-CrmB protein. Columns of different colors show optical density values obtained with different proteins adsorbed on the ELISA microplate (CrmB, A30, or TNF-BD). Panel (a) shows the results obtained after 3 immunizations; panel (b), results obtained after the 4th immunization.

препятствием на пути создания биотерапевтических препаратов (Pineda et al., 2016).

Перспективным направлением лечения аутоиммунных заболеваний является развитие генной терапии. Генная терапия обладает рядом преимуществ по сравнению с биологической терапией белковыми препаратами: обеспечивается стабильная долговременная экспрессия терапевтического гена; целевой белковый продукт концентрируется в месте патологии и минимизируются системные побочные эффекты (Evans, Robbins, 1999). При экспрессии терапевтического гена непосредственно в месте введения для достижения терапевтического эффекта потребуются гораздо меньшая концентрация белка, чем при инъекции рекомбинантного белка (Bandara et al., 1993; Gouze et al., 2003; Kim et al., 2003); отпадает необходимость повторных инъекций.

В модели коллаген-индуцированного артрита у крыс нами недавно была показана возможность генной терапии этого заболевания в результате двукратного внутримышечного введения рекомбинантной плазмиды pcDNA/sTNF-BD, кодирующей TNF-BD белка CrmB вируса натуральной оспы (Щелкунов и др., 2016).

Известно, что один из ключевых факторов, определяющих эффективность генной терапии, – иммуногенность продукта трансгена. Так, в экспериментах на крысах с использованием рекомбинантных аденовирусов и лентивирусов, кодирующих IL-1Ra или GFP, было показано, что целевой продукт у иммунокомпетентных животных не детектируется уже через 21 сут, в то время как у бестимусных животных он обнаруживался на протяжении по крайней мере 5 мес. (Gouze et al., 2007). Известно, что иммуногенность рекомбинантных плазмидных векторов существенно ниже, чем у рекомбинантных вирусов (Li, Huang, 2006).

Целью данной работы было изучение индукции гуморального иммунного ответа на терапевтические TNF-связывающие белки при введении терапевтически эффективных доз препаратов этих рекомбинантных белков (Gileva et al., 2006) или рекомбинантных плазмид, кодирующих данные белки (Щелкунов и др., 2016).

Иммуногенность рекомбинантных белков VARV-CrmB и TNF-BD проверяли относительно вирионного поксвирусного белка A30, используемого в данном случае в качестве контроля. A30 – белок, необходимый для слияния мембран вируса и клетки, индуцирует синтез В-клетками вируснейтрализующих антител (Разумов и др., 2005) и является одним из ключевых антигенов, вызывающих иммунный ответ, при попадании вируса в организм. Выбор белка A30 как контроля в данном эксперименте обусловлен тем, что для него показана высокая иммуногенность (Sakhatsky et al., 2008).

Плазида pcDNA3.1 – эффективный вектор для продукции целевых белков *in vivo*. На его основе нами были созданы рекомбинантные плазмиды pcDNA/TNF-BD и pcDNA/CrmB.

Поскольку отсутствовала достаточно чувствительная система детекции продукции целевых рекомбинантных вирусных белков *in vivo*, нами выполнены эксперименты по анализу продукции белка GFP, ген которого был встроен в ту же самую векторную плазмиду pcDNA3.1. На этой модельной системе было продемонстрировано, что спустя 3 сут после внутримышечной инъекции мышам плазмиды pcDNA/GFP в мышечной ткани задней конечности наблюдался четко локализованный синтез целевого белка по ходу раневого канала (см. рис. 1, а), а на 7-е сут в зоне инъекции выявлены эффективная наработка белка GFP и его распространение в близлежащие ткани (см. рис. 1, б).

Анализ индукции синтеза антител против целевых белков при введении соответствующих плазмид или препаратов очищенных рекомбинантных белков показал, что после первой и второй внутримышечных инъекций с интервалом в две недели продукции специфичных антител ни для одного из изучаемых препаратов выявлено не было. После третьей инъекции выраженный иммунный ответ установили для группы мышей, иммунизированных рекомбинантным белком CrmB (см. рис. 2, а). Для остальных групп мышей при этом не зафиксировали достоверное отличие концентраций антител к целевым белкам по сравнению с контролем. После четвертой инъекции наряду с увеличенным уровнем антител против белка CrmB выраженный специфичный иммунный ответ выявили также для мышей, иммунизированных рекомбинантными белками A30 и TNF-BD (см. рис. 2, б).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что специфический иммунный ответ против целевых белков при многократной инъекции терапевтических доз рекомбинантных плазмид не детектируется, в то время как для рекомбинантных белков он обнаруживается уже после третьей-четвертой иммунизации, что может указывать на затруднения при длительном применении последних.

Таким образом, на основании результатов проведенного исследования можно заключить, что локальное введение рекомбинантных плазмид, направляющих синтез терапевтических белков, обуславливает гораздо меньший иммуногенный эффект по отношению к этим белкам по сравнению с инъекцией препаратов соответствующих рекомбинантных белков.

Acknowledgments

This work was supported by the Russian Science Foundation, project 14-15-00050.

The authors are grateful to I.P. Gileva for the kindly provided plasmid.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Bandara G., Mueller G.M., Galea-Lauri J., Tindal M.H., Georgescu H.I., Suchanek M.K., Hung G.L., Glorioso J.C., Robbins P.D., Evans C.H. Intraarticular expression of biologically active interleukin 1-receptor-antagonist protein by *ex vivo* gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993;90(22):10764-10768.
- Bendtsen K., Bliddal H., Stoltenberg M., Szkudlarek M., Fana V., Lindegaard H.M., Omerovic E., Højgaard P., Jensen E.K., Bouchelouche P.N. Antibodies to infliximab and adalimumab in patients with rheumatoid arthritis in clinical remission: a cross-sectional study. *Arthritis*. 2015;2015:784825. DOI 10.1155/2015/784825.
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 1976;72:248-254.
- Brasington J.R., Kahl L., Ranganathan P., Cheng T.P., Atkinson J. Immunologic rheumatic disorders. *J. Allergy Clin. Immunol*. 2010; 125(Suppl. 2):204-215. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2009.10.067>.
- Casadevall N., Nataf J., Viron B., Kolta A., Kiladjian J.J., Martin-Dupont P., Michaud P., Papo T., Ugo V., Teyssandier I., Varet B., Mayeux P. Pure red-cell aplasia and antierythropoietin antibodies in patients treated with recombinant erythropoietin. *N. Engl. J. Med*. 2002;346(7):469-475. DOI 10.1056/NEJMoa011931.
- Chen Y.M., Tsai W.C., Tseng J.C., Chen Y.H., Hsieh C.W., Hung W.T., Lan J.L. Significant associations of antidrug antibody levels with serum drug trough levels and therapeutic response of adalimumab and etanercept treatment in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis*. 2015;74(3):e16. DOI 10.1136/annrheumdis-2013-203893.
- Drutskaya M.S., Efimov G.A., Zvartsev R.V., Chashchina A.A., Chudakov D.M., Tillib S.V., Papov A.A., Nedospasov S.A. Experimental models of arthritis in which pathogenesis is dependent on TNF expression. *Biochemistry. (Moscow)*. 2014;79(12):1349-1357. DOI 10.1134/S0006297914120086.
- Eng G.P., Bendtsen K., Bliddal H., Stoltenberg M., Szkudlarek M., Fana V., Lindegaard H.M., Omerovic E., Højgaard P., Jensen E.K., Bouchelouche P.N. Antibodies to infliximab and adalimumab in patients with rheumatoid arthritis in clinical remission: a cross-sectional study. *Arthritis*. 2015;2015:784825. DOI 10.1155/2015/784825.
- Evans C.H., Ghivizzani S.C., Robbins P.D. Arthritis gene therapy and its tortuous path into the clinic. *Transl. Res*. 2013;161:205-216. DOI 10.1016/j.trsl.2013.01.002.

- Evans C.H., Robbins P.D. Gene therapy of arthritis. *Intern. Med.* 1999; 38(3):233-239.
- Gileva I.P., Malkova E.M., Nepomnyashchikh T.S., Vinogradov I.V., Lebedev L.P., Kochneva G.V., Grazhdantseva A.A., Ryabchikova E.I., Shchelkunov S.N. Influence of variola virus TNF-binding protein on experimental LPS-induced endotoxic shock. *Tsitokiny i vospalenie=Cytokines and Inflammation.* 2006;5(1):44-49. (in Russian)
- Gileva I.P., Nepomnyashchikh T.S., Antonets D.V., Lebedev L.R., Kochneva G.V., Grazhdantseva A.V., Shchelkunov S.N. Properties of the recombinant TNF-binding proteins from variola, monkeypox, and cowpox viruses are different. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006; 1764:1710-1718.
- Gileva I.P., Viazovaia E.A., Toporkova L.B., Tsyrendorzhiev D.D., Shchelkunov S.N., Orlovskaya I.A. TNF binding protein of variola virus acts as a TNF antagonist at epicutaneous application. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2015;16:72-76.
- Gouze E., Gouze J.N., Palmer G.D., Pilapil C., Evans C.H., Ghivizzani S.C. Transgene persistence and cell turnover in the diarthrodial joint: implications for gene therapy of chronic joint diseases. *Mol. Ther.* 2007;15(6):1114-1120. DOI 10.1038/sj.mt.6300151.
- Gouze J.-N., Gouze E., Palmer G.D., Liew V.S., Pascher A., Betz O.B., Thornhill T.S., Evans C.H., Grodzinsky A.J., Ghivizzani S.C. A comparative study of the inhibitory effects of interleukin-1 receptor antagonist following administration as a recombinant protein or by gene transfer. *Arthritis Res. Ther.* 2003;5(5):R301-R309. DOI 10.1186/ar795.
- Karampetsou M.P., Lioussis S.N.C., Sfrikakis P.P. TNF-antagonists beyond approved indications: stories of success and prospects for the future. *QJM.* 2010;103(12):917-928.
- Kim J.M., Jeong J.G., Ho S.H., Hahn W., Park E.J., Kim S., Yu S.S., Lee Y.W., Kim S. Protection against collagen-induced arthritis by intramuscular gene therapy with an expression plasmid for the interleukin-1 receptor antagonist. *Gene Ther.* 2003;10(18):1543-1550.
- Krieckaert C.L., Jamnitski A., Nurmohamed M.T., Kostense P.J., Boers M., Wolbink G. Comparison of long-term clinical outcome with etanercept treatment and adalimumab treatment of rheumatoid arthritis with respect to immunogenicity. *Arthritis Rheum.* 2012; 64(12):3850-3855. DOI 10.1002/art.34680.
- Lebedev L.R., Ryazankin I.A., Sizov A.A., Ageenko V.A., Odegov A.M., Afinogenova G.N., Shchelkunov S.N. A method for purification of tumor necrosis factor antagonists and a study of some of their characteristics. *Biotechnologiya=Biotechnology.* 2001;6:14-18. (in Russian)
- Lee S.J., Chinen J., Kavanaugh A. Immunomodulator therapy: monoclonal antibodies, fusion proteins, cytokines, and immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010;125(Suppl. 2):314-323. DOI 10.1016/j.jaci.2009.08.018.
- Li J., Yang C., Xia Y., Bertino A., Glaspy J., Roberts M., Kuter D.J. Thrombocytopenia caused by the development of antibodies to thrombopoietin. *Blood.* 2001;98(12):3241-3248. DOI 10.1182/blood.V98.12.3241.
- Li S.D., Huang L. Gene therapy progress and prospects: non viral gene therapy by systemic delivery. *Gene Ther.* 2006;13(18):1313-1319. DOI 10.1038/sj.gt.3302838.
- Nepomnyashchikh T.S., Antonets D.V., Shchelkunov S.N. Gene therapy of arthritis. *Russ. J. Genetics.* 2016;52(6):543-556. DOI 10.7868/S001667581605009X.
- Pineda C., Castañeda Hernández G., Jacobs I.A., Alvarez D.F., Carini C. Assessing the immunogenicity of biopharmaceuticals. *BioDrugs.* 2016;30(3):195-206. DOI 10.1007/s40259-016-0174-5.
- Razumov I.A., Gileva I.P., Vasil'eva M.A., Nepomniashchikh T.S., Mishina M.N., Belanov E.F., Kochneva G.V., Kononov E.E., Shchelkunov S.N., Loktev V.B. Neutralizing monoclonal antibodies cross-react with fusion proteins encoded by 129I of the Ectromelia virus and A30I of the variola virus. *Molekulyarnaya Biologiya = Molecular Biology (Moscow).* 2005;39(6):1046-1054. (in Russian)
- Sakhatsky P., Wang S., Zhang C., Chou T.H., Kishko M., Lu S. Immunogenicity and protection efficacy of subunit-based smallpox vaccines using variola major antigens. *Virology.* 2008;371:98-107.
- Schellekens H. Immunogenicity of therapeutic proteins: clinical implications and future prospects. *Clin. Ther.* 2002;24(11):1720-1740. DOI 10.1016/S0149-2918(02)80075-3.
- Sfikakis P.P., Tsokos G.C. Towards the next generation of anti TNF drugs. *Clin. Immunol.* 2011;141(3):231-235. DOI 10.1016/j.clim.2011.09.005.
- Shankar G., Pendley C., Stein K.E. A risk-based bioanalytical strategy for the assessment of antibody immune responses against biological drugs. *Nat. Biotechnol.* 2007;25(5):555-561. DOI 10.1038/nbt1303.
- Shchelkunov S.N. Orthopoxvirus genes that mediate disease virulence and host tropism. *Adv. Virol.* 2012;ID 524743. DOI 10.1155/2012/524743.
- Shchelkunov S.N., Taranov O.S., Tregubchak T.V., Maksyutov R.A., Silkov A.N., Nesterov A.E., Sennikov S.V. The gene therapy of collagen-induced arthritis in rats by intramuscular administration of the plasmid encoding the TNF-binding domain of variola virus CrmB protein. *Doklady Akademii Nauk = Proceedings of the Russian Academy of Sciences.* 2016;469(4):504-507. (in Russian)
- Shchelkunova G.A., Shchelkunov S.N., Immunomodulating Drugs based on poxviral proteins. *BioDrugs.* 2016;30:9-16. DOI 10.1007/s40259-016-0158-5.
- Tregubchak T.V., Shekhovtsov S.V., Nepomnyashchikh T.S., Peltek S.E., Kolchanov N.A., Shchelkunov S.N. TNF-binding domain of the variola virus CrmB protein synthesized in *Escherichia coli* cells effectively interacts with human TNF. *Doklady Akademii Nauk = Proceedings of the Russian Academy of Sciences.* 2015;462(1):176-180. DOI 10.1134/S1607672915030102. (in Russian)
- Tsyrendorzhiev D.D., Orlovskaya I.A., Sennikov S.V., Tregubchak T.V., Gileva I.P., Tsyrendorzhieva M.D., Shchelkunov S.N. Biological effects of individually synthesized TNF-binding domain of variola virus CrmB protein. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i Meditsiny=Bulletin of Experimental Biology i Medicine.* 2014;157(2):214-217. (in Russian)
- Tsyrendorzhiev D.D., Sennikov S.V., Orlovskaya I.A., Gileva I.P., Ryazankin I.A., Toporkova L.B., Kurilin V.V., Lopatnikov Y.A., Grydina A.A., Shchelkunov S.N. Efficiency of recombinant TNF-binding protein from variola virus in a model of collagen-induced arthritis. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology.* 2013;15(6):513-524. (in Russian)
- Venkatesha S.H., Dudics S., Acharya B., Moudgil K.D. Cytokine modulating strategies and newer cytokine targets for arthritis therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 2015;16(1):887-906. DOI 10.3390/ijms16010887.
- Vincent F.B., Morand E.F., Murphy K., Mackay F., Mariette X., Marcelli C. Antidrug antibodies (ADAb) to tumour necrosis factor (TNF)-specific neutralising agents in chronic inflammatory diseases: a real issue, a clinical perspective. *Ann. Rheum. Dis.* 2013;72(2):165-178. DOI 10.1136/annrheumdis-2012-202545.



Анализ полиморфизма экзона-4 гена *VERNALIZATION-A1* у видов полиплоидной пшеницы

А.Ф. Мутерко , Е.А. Салина

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

Одними из ключевых генов в селекции пшеницы, влияющих на адаптивность и урожайность культуры, являются гены *VRN1*. В недавних исследованиях установлена ассоциация полиморфизма нуклеотидной последовательности четвертого экзона гена *VRN-A1* с вариативностью количественных показателей ряда агрономически ценных признаков озимой пшеницы, таких как чувствительность к продолжительности яровизации, морозостойкость, время выхода в трубку и время колошения. Однако эти исследования были выполнены на ограниченном количестве сортов *T. aestivum* и не охватывали другие виды полиплоидной пшеницы. В ранних исследованиях не предполагалось наличия более чем одной копии гена *VRN-A1* на геноме. Кроме того, только недавно было показано, что ген *VRN-D4* отличается от *VRN-A1* всего по нескольким однонуклеотидным мутациям. В настоящей работе проанализировано распределение гаплотипов экзона-4 гена *VRN-A1* в 158 образцах 6 видов тетраплоидной и 5 видов гексаплоидной пшеницы, несущих различные аллели этого гена. Для идентификации гаплотипов экзона-4 гена *VRN-A1* был разработан кодоминантный маркер, основанный на модуляции кривизны молекул ДНК. Полиморфизм экзона-4 выявлен исключительно в гексаплоидной пшенице и ассоциирован с наличием не менее чем двух копий гена *VRN-A1* в геноме. За исключением одного образца, мутантный тип экзона-4 встречался только в комбинации с диким типом. Разработаны аллель-специфические праймеры, благодаря которым, в отличие от существующих методов, можно исключить гаплотипы гена *VRN-D4* в ходе анализа гаплотипов *VRN-A1*. В результате расширения анализируемого участка идентифицированы дополнительные гаплотипы, ассоциированные с полиморфизмом адениновых трактов в интроне-4. При этом получено расщепление по гаплотипу среди образцов, характеризующихся только одним, диким, типом экзона-4 *VRN-A1*, а также доминантных аллелей этого гена. На основании установленных ассоциаций между гаплотипом и аллельным вариантом гена *VRN-A1* в тетраплоидной пшенице вида *Triticum dicoccum* идентифицирован новый, предположительно доминантный, аллель этого гена (обозначен *Vrn-A1k*), несущий 42 п. н. инсерцию в области промотора.

Ключевые слова: пшеница; ген *VRN-A1*; полиморфизм экзона 4; гаплотипы.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Мутерко А.Ф., Салина Е.А. Анализ полиморфизма экзона-4 гена *VERNALIZATION-A1* у видов полиплоидной пшеницы. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(3):323-333. DOI 10.18699/VJ16.19-o

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Muterko A.F., Salina E.A. Analysis of the *VERNALIZATION-A1* exon-4 polymorphism in polyploid wheat. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(3):323-333. DOI 10.18699/VJ16.19-o

Analysis of the *VERNALIZATION-A1* exon-4 polymorphism in polyploid wheat

A.F. Muterko , E.A. Salina

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

One of the key genes that influence the adaptability of wheat to environments and yield are the *VRN1* genes. In recent studies, an association of missense mutations within *VERNALIZATION-A1* exon-4 with modulation of quantitative values of such agronomically valuable traits as frost tolerance, vernalization requirement duration and flowering time of wheat was shown. However, these investigations were carried out exclusively in *T. aestivum* varieties and have not covered other species of polyploid wheat and different *VRN-A1* alleles. The earlier studies did not consider more than one copy of *VRN-A1* per genome. Furthermore, only recently it was shown that only several SNPs distinguish the *VRN-D4* and *VRN-A1* genes. In the present study, *VRN-A1* exon-4 polymorphism was investigated in 158 accessions of 6 tetraploid and 5 hexaploid wheat species carrying the different *VRN-A1* alleles. To identify the *VRN-A1* exon-4 haplotypes, a co-dominant marker was designed, based on modulation of the curvature of the DNA molecule. Polymorphism of the *VRN-A1* exon-4 was revealed only in hexaploid wheat accessions and was associated with the presence of not less than two copies of *VRN-A1* per genome. With the exception of one accession, the mutant type of exon-4 was identified only in combination with the wild type. Furthermore, allele-specific primers were designed to identify the *VRN-D4* gene or in order to exclude its impact on the results during analysis of the *VRN-A1* haplotypes. By expanding the region being analyzed, additional haplotypes, which are associated with polymorphism of adenine tracts within intron-4, were identified. Haplotype segregation was attained among accessions carrying only intact exon-4 of *VRN-A1* and among dominant alleles of this gene. Finally, based on the associations revealed between the *VRN-A1* alleles and haplotypes, the new putative dominant *VRN-A1* allele (designated *Vrn-A1k*) carrying a 42-bp insertion within the promoter region was identified in tetraploid wheat of *Triticum dicoccum*.

Key words: wheat; *VRN-A1*; exon 4 polymorphism; haplotypes.

Необходимость воздействия условий низких температур и укороченного фотопериода для инициации перехода растения к репродуктивной стадии развития обуславливает его потребность в яровизации. У пшеницы потребность в яровизации детерминирована аллельным состоянием генов системы *VRN*: *VRN1* (транскрипционный фактор семейства MADS-box); *VRN2* (zinc-finger CCT домен содержащий ген – *ZCCT*); *VRN3* (гомолог гена *FLOWERING LOCUS T*); *VRN4* (дупликация гена *VRN-A1* в коротком плече хромосомы 5D) (Yan et al., 2003, 2004b, 2006; Kippes et al., 2015). Исследование генов *VRN* имеет ключевое значение в селекции пшеницы, поскольку их экспрессия влияет на ряд агрономически ценных признаков, определяющих адаптивность и урожайность культуры в условиях окружающей среды конкретного географического региона. Однако из-за особенностей распространения в пшенице аллелей различных генов *VRN*, а также их различного влияния на фенотип наиболее перспективно исследование генов *VRN1*.

Гены *VRN1* картированы в середине длинного плеча хромосом пятой гомеологической группы (Yan et al., 2003) и ассоциированы с регуляцией перехода от вегетативной к репродуктивной стадии развития (Danyluk et al., 2003). Доминантные аллели *VRN1* обуславливают яровой или факультативный тип развития (отсутствие потребности в яровизации или ее частичное сохранение соответственно), тогда как рецессивные аллели характеризуются необходимостью в яровизации и обуславливают озимый тип развития. В то время как альтернативные доминантные аллели генов *VRN1* оказывают различное влияние на количественные показатели ряда качественных признаков в яровых сортах, полиморфизм рецессивного аллеля *vrn1* ассоциирован с модуляцией чувствительности к продолжительности яровизации, морозостойкости, времени выхода в трубку и колошения озимой пшеницы (Chen et al., 2009; Dhillon et al., 2010; Eagles et al., 2011; Díaz et al., 2012; Li et al., 2013; Yan et al., 2015).

Структура генов *VRN1* представлена восьмью экзонами, шесть из которых кодируют два функциональных домена (MADS- и К-боксы) (Yan et al., 2003), обеспечивающих белок-белковые взаимодействия и связывание с регуляторными последовательностями аффлекторных генов. Первый экзон кодирует домен суперсемейства MADS – SRF-TF (Treisman, 1992). Аминокислотная последовательность домена SRF (Serum Response Factor) семейства TF (Transcription Factor) включает в себя несколько функционально активных сайтов, таких как сайт фосфорилирования, димеризации, а также сайт, обеспечивающий связывание MADS-бокса содержащего белка с ДНК (Santelli, Richmond, 2000). Частично 2-й, а также экзоны 3–6 кодируют аминокислотную последовательность К-домена, которая, как правило, детектируется во всех транскрипционных факторах SRF-типа. К-букс вовлечен в белок-белковые взаимодействия с другими MADS-боксами содержащими белками (Yang et al., 2004) посредством образования суперспиральных структур (Lupas et al., 1991).

Из трех гомеологических генов, *VRN-A1*, *VRN-B1* и *VRN-D1*, полиморфизм нуклеотидной последовательности кодирующей части, ассоциированный с влиянием на ряд признаков, имеющих большое значение в селек-

ции озимой пшеницы, выявлен только для гена *VRN-A1*. В зависимости от типа нуклеотида в позиции 20 п.н. четвертого экзона гена *VRN-A1* различают С- и Т-типы экзона-4, обозначенные здесь как Ex4C и Ex4T гаплотипы. Мисенс-мутация С→Т в экзоне-4 гена *VRN-A1*, приводящая к замещению консервативного лейцина на фенилаланин в аминокислотной последовательности К-домена (Leu¹¹⁷→Phe¹¹⁷), впервые идентифицирована в озимых сортах мягкой пшеницы *Triticum aestivum* из США (Chen et al., 2009). Выявленный полиморфизм в четвертом экзоне ассоциировали с различием во времени выхода в трубку и временем колошения. В частности, озимые сорта, характеризующиеся экзонам-4 дикого типа (гаплотип Ex4C), выколашивались раньше, чем сорта с мутантным типом (гаплотип Ex4T) (Chen et al., 2009). Позже аналогичные наблюдения подтвердили и на австралийских сортах и дополнили их новыми данными, указывающими на ассоциацию гаплотипа Ex4T с повышением морозостойкости озимых сортов *T. aestivum* и потребностью в продолжительной яровизации (Eagles et al., 2011). Кроме того, предполагается, что поскольку К-домен вовлечен во взаимодействие с другими MADS-боксами содержащими белками, С/Т полиморфизм в четвертом экзоне гипотетически может влиять на ряд других признаков, выраженность которых ассоциирована с экспрессией гена *VRN-A1* (Eagles et al., 2011).

Ген *VRN-A1* в гексаплоидной пшенице может быть представлен двумя и более копиями на геноме (Díaz et al., 2012; Würschum et al., 2015). Есть предположение, что число копий *VRN-A1* позитивно коррелирует с потребностью в продолжительной яровизации (продолжительность яровизации до полного насыщения, когда дальнейшее увеличение периода яровизации уже не приводит к сокращению времени до колошения) и сроками колошения пшеницы (Díaz et al., 2012). Тем не менее данное предположение остается дискуссионным, поскольку среди копий *VRN-A1* также наблюдается полиморфизм экзона-4.

Следует отметить, что все существующие исследования полиморфизма экзона-4 гена *VRN-A1* проводились исключительно на сортах *T. aestivum* и в настоящее время отсутствуют данные об аналогичных исследованиях для других видов полиплоидной пшеницы. В большинстве случаев анализ выполнялся без учета копийности гена *VRN-A1*, что особенно важно для гексаплоидной пшеницы, в которой, к примеру, у *T. aestivum*, более 90 % сортов несут две-три копии этого гена (Würschum et al., 2015) с различными комбинациями гаплотипов экзона-4 (Díaz et al., 2012). Кроме того, недавнее позиционное клонирование гена *VRN-D4* выявило, что только четыре однонуклеотидных полиморфизма (ОНП) отличают его от *VRN-A1* (Kippes et al., 2015). Следовательно, результаты предыдущих исследований должны быть пересмотрены также с учетом и этого обстоятельства, поскольку при использовании существующих методов анализа не представляется возможным различить экзоны-4 генов *VRN-A1* и *VRN-D4*. Наконец, существующие методы идентификации типа экзона-4 *VRN-A1* имеют ряд недостатков, которые ограничивают их широкое применение в исследовании влияния соотношения числа копий гена *VRN-A1* с различным типом экзона-4 на фенотип.

В настоящей работе полиморфизм экзона-4 исследуется в доминантных и рецессивных аллелях гена *VRN-A1* у представителей 11 видов гексаплоидной и тетраплоидной пшеницы. Для проведения качественного и количественного анализов оптимизирована аллель-специфическая ПЦР и разработаны особого типа кодоминантные ДНК-маркеры к гаплотипам экзона-4 гена *VRN-A1*. Анализ выполнен с учетом влияния гена *VRN-D4* на результаты исследования.

Материалы и методы

Генетический материал. Исследовали геномную ДНК 158 образцов пяти видов гексаплоидной пшеницы (геномный состав BBA^aA^aDD): *T. aestivum* L., *T. spelta* L., *T. macha* Dekap, *T. compactum* Host, *T. sphaerococcum* Percival и шести тетраплоидных видов (геном BBA^aA^a): *T. durum* Desf., *T. turgidum* L., *T. polonicum* L., *T. carthlicum* Nevski, *T. dicoccum* Schrank и *T. dicoccoides* Körn.

Анализировали местные сорта озимой мягкой пшеницы вида *T. aestivum*, а также образцы, полученные из Национальной системы зародышевой плазмы растений (National Plant Germplasm System (NPGS), <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs>), IPK Gatersleben (https://gbis.ipk-gatersleben.de/GBIS_I/home.jsf) и Национального центра генетических ресурсов растений Украины (yuriev1908@gmail.com).

Экстракция ДНК, амплификация и гель-электрофорез. Тотальная ДНК экстрагирована из четырех дневных проростков с применением ЦТАБ (по Doyle et al., 1987, с модификацией). ДНК выделена из двух-пяти индивидуальных растений каждого образца.

Реакционная смесь для полимеразной цепной реакции (ПЦР) включала: ДНК (~60 нг), 20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2.5 mM MgCl₂, 1 mM KCl, 0.1 % Triton X-100, 250 мкМ dNTPs, 1.5 % ДМСО, 3 нг/мкл каждого праймера, 0.05 Е/мкл Taq полимеразы. Нуклеотидные последовательности праймеров и температура отжига приведены в табл. 1. ПЦР выполнена по следующей программе: денатурация 94 °C (2 мин); 36 циклов амплификации: 94 °C (10 с), отжиг (10 с), 74 °C (40 с); финальная элонгация 72 °C (5 мин).

Электрофорез продуктов амплификации проведен в неденатурирующих полиакриламидных гелях (ПААГ) в оптимизированных ранее условиях (Muterko et al., 2016), усиливающих anomalно медленную миграцию искривленных молекул ДНК. Агарозный гель-электрофорез выполнен с использованием 1.5 % агарозных гелей в 1× ТБЭ буфере. ПААГ и агарозные гели были визуализированы путем окрашивания бромидом этидия (0.5 мкг/мл) и документированы при помощи системы «Gel Doc XR» (Bio-Rad Laboratories).

Секвенирование фрагментов ПЦР. Продукты ПЦР переосаждали этанолом в присутствии линейного акриламида (15 мкг) в качестве носителя. В случае наличия в амплификате нескольких целевых фрагментов нужные ампликоны были вырезаны из агарозных и полиакриламидных гелей и очищены на спин-колонках с silica-мембраной. Секвенирование проведено с помощью «BigDye Terminator v3.1 sequencing kit» и последующим анализом продуктов на «ABI 3130xl Genetic Analyzer» (ЦКП «Ге-

номика» СО РАН). Нуклеотидные последовательности анализируемых участков гена *VRN-A1* депонированы в GenBank под номерами доступа: KU844092 (Ex4C), KU844091 (Ex4T), KT983448 (Ex4C), KT983449 (Ex4C.f), KU844093 (Ex4C), KX874600 (Ex4C.sph), KX874601 (Ex4T), KX874602 (Ex4C.m), KX874603 (Ex4C.s), KX874604 (Ex4C.s), KX874605 (Ex4C.f), KX874606 (Ex4C.f), KX874607 (Ex4T), KX874608 (*Vrn-A1k*).

Анализ данных. Для исследования распределения кривизны и выявления локальных изгибов предполагаемую форму молекул ДНК рассчитали из нуклеотидных последовательностей, основываясь на конформационных параметрах двойной спирали, извлеченных по ранее описанному способу (Muterko et al., 2015). Трехмерные модели спирали молекул ДНК визуализированы с использованием PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7.2 (Schrödinger, LLC).

Распределение кривизны молекулы ДНК анализировали в скользящем окне размером 40 п. н. и шагом 1 п. н. В качестве кривизны молекулы в позиции $i+1$ ($1 < i < n$) было принято значение, обратное радиусу описанной окружности треугольника, вершины которого лежат на оси спирали с координатами $i-20$; i ; $i+20$ п. н. Кривизну оценивали в единицах кривизны молекулы ДНК, где в качестве единицы принята средняя кривизна ДНК в кристаллизованном нуклеосомном коре ($1/42.8 \text{ \AA}$).

Результаты

Разработка кодоминантных ДНК-маркеров для анализа полиморфизма экзона-4 гена *VRN-A1*. Анализ нуклеотидной последовательности альтернативных гаплотипов экзона-4 выявил, что С/Т полиморфизм ассоциирован с нарушением аденинового тракта (А-тракт, AnTm, $n+m > 4$), протяженностью 5 п. н. (A(T)₄) (рис. 1). А-тракты индуцируют локальные изгибы молекулы ДНК и определяют ее глобальную кривизну (Koo et al., 1986). Изогнутые молекулы ДНК мигрируют anomalно медленно в ПАА гелях по сравнению с неизогнутыми молекулами той же длины (Marini et al., 1982), при этом решающее значение имеют длина и локализация А-трактов (Koo et al., 1986; Diekmann, 1992). В связи с этим исследована возможность использования разницы в скорости миграции ПЦР-фрагментов с различной кривизной ДНК, обусловленной полиморфизмом А-тракта, для идентификации альтернативных гаплотипов экзона-4 гена *VRN-A1*. ПЦР была оптимизирована с парой праймеров, Ex4F2m3 и Ex4R, охватывающих участок от интрона-2 (частично) до середины интрона-4 гена *VRN-A1*. Нуклеотидная последовательность сайта отжига праймера Ex4F2m3 различается в гомеологичных геномах только двумя ОНП, локализованными во второй и седьмой позициях относительно 3'-конца, поэтому для повышения специфичности связывания праймера с последовательностью ДНК из генома А было искусственно создано нарушение комплементарности в третьей позиции от 3'-конца. В результате разделения продуктов амплификации в ПАА гелях в условиях, усиливающих anomalно медленную миграцию изогнутых молекул ДНК, наблюдается хорошо заметная разница в скорости миграции фрагментов ПЦР, соответствующих С- и Т-типу экзона-4 гена *VRN-A1*. Ампликоны,

Table 1. Primers for PCR

Primer	Sequence (5'–3')	Designed by	Annealing temperature, °C	Amplicon	Allele/haplotype	Amplicon size, bp
VRN1AF	gaaaggaaaaattctgctcg	Yan et al., 2004a	58	VRN-A1 promoter	vrn-A1	713
VRN1-INT1R	gcaggaaatcgaaatcgaa				Vrn-A1a.1	944
					Vrn-A1a.2	924, 944
					Vrn-A1a.3	765
					Vrn-A1b	691
					Vrn-A1d	685
					Vrn-A1e	659
					Vrn-A1f	658
					Vrn-A1i	713
					Vrn-A1k	755
					vrn-A ^m 1	705
					Vrn-A ^m 1g	681
					Vrn-A ^m 1a	671
					vrn-A ^m 1b	656
Vrn-A1-intr_F	ccgtcgaaaggatcgctactg	Muterko et al., 2016	60	VRN-A1 intron-1	vrn-A1	541
Vrn-A1-intr_R1	cttgtccccgtgagctacttac					
Ex1/C/F	gttctccaccgagtcatggt	Fu et al., 2005	56	VRN-A1 intron-1	Vrn-A1c (Langdon)	522
Intr1/A/R3	aagtaagacaacacgaatgtgaga				Vrn-A1c (IL369)	2188
Ex4F2m3	ttgttccttctgtccaacc	Eagles et al., 2011 (with modifications)	60	VRN-A1/VRN-D4 exons-3-4	Ex4(C/T)	389
Ex4R	cttgctgaacttctctgc				Ex4C.f	387
Ex4FA	ttcacctctagcctacccaac		58	VRN-A1/VRN-D4 exons-3-4	Ex4(C/T)	523
Ex4R	cttgctgaacttctctgc				Ex4C.f	521
Ex4F2m3	ttgttccttctgtccaacc		59	VRN-D4 exons-3-4	VRN-D4	265
V4/R2m3	ccagttgctgcaactccagg					
Ex4outV4F2m3	cctgtcccacccaagtacta		57	VRN-A1 exons-3-4	Ex4(C/T)	380
Ex4R	cttgctgaacttctctgc				Ex4C.f	378
Ex4F2m3	ttgttccttctgtccaacc		58	VRN-A1/VRN-D4 exons-3-5	Ex4C.sph	592
Ex4AR245m3	gaccagttcgaataccgaagaa				Ex4C.f	588
					Ex4C.m/ Ex4T	591
					Ex4C.s	590
Ex4outV4F2m3	cctgtcccacccaagtacta		57	VRN-A1 exons-3-5	Ex4C.sph	583
Ex4AR245m3	gaccagttcgaataccgaagaa				Ex4C.f	579
					Ex4C.m/ Ex4T	582
					Ex4C.s	581

идентифицирующие гаплотип Ex4T, содержат А-тракт длиной 5 п. н., локализованный вблизи центра фрагмента, и мигрируют аномально медленно в результате более сильного изгиба молекулы ДНК (см. рис. 1), в то время как у фрагментов Ex4C А-тракт нарушен вследствие мутации центрального нуклеотида, что нивелирует кривизну на данном участке. Разница между фрагментами ПЦР гаплотипов Ex4C (GenBank: KU844092, KT983448) и Ex4T (GenBank: KU844091), измеренная относительно маркера молекулярного веса, составляла до 50 п. н. в условиях электрофореза, усиливающих аномально медленную ми-

грацию искривленных молекул ДНК, при этом различие в скорости миграции этих фрагментов не наблюдалось в агарозных гелях и при проведении электрофореза в ПААГ в стандартных условиях. Таким образом, ПЦР-фрагменты альтернативных гаплотипов экзона-4 можно было достоверно обозначить, подтверждая эффективность применения разработанного метода для идентификации дикого (Ex4C) и мутантного (Ex4T) типа четвертого экзона гена *VRN-A1*.
В нескольких образцах ампликоны, детектирующие гаплотип Ex4C, обладали более высокой скоростью ми-

грации (см. рис. 1), данный вариант гаплотипа обозначен как Ex4C.f (GenBank: KT983449). В результате сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов Ex4C и Ex4C.f установлено, что гаплотип Ex4C.f характеризуется 2 п. н. делецией и ОНП (C→G) в области интрона-4. Кроме того, данная делеция локализована в структуре А-тракта и приводит к сокращению его длины от 7 до 5 п. н., что сопровождается уменьшением угла изгиба и распрямлением молекулы ДНК (см. рис. 1). Гаплотип Ex4Cf был ассоциирован с доминантным аллелем *Vrn-A1a* (*Vrn-A1a.1/2*), а также аллелями *Vrn-A1e* и *Vrn-A1i*. Кроме того, два образца тетраплоидной пшеницы вида *T. dicoccoides* (PI 352322, UA0300256), образец гексаплоидной пшеницы вида *T. spelta* (UA0300246) и *T. aestivum* (TRI 3088), несущие рецессивный аллель *vrn-A1*, также характеризовались гаплотипом Ex4Cf.

Данные анализа наиболее распространенных в полиплоидной пшенице доминантных аллелей гена *VRN-A1* (*Vrn-A1a/b/c/e/i*), идентифицированных в исследуемом генетическом материале, были дополнены результатами анализа находящихся в открытом доступе нуклеотидных последовательностей большинства известных аллелей гена *VRN-A1*, в том числе аллелей, идентифицированных в диплоидной пшенице *T. monosocum* (*Vrn-A^m1a/b/f/g/h*). Установлено, что все доминантные аллели гена *VRN-A1* характеризуются интактным экзон-4 с гаплотипом Ex4C или Ex4C.f.

Мутантный гаплотип Ex4T идентифицирован только в образцах гексаплоидной пшеницы, несущих рецессивный аллель *vrn-A1*. За исключением образца TRI 290 (GenBank: KX874601), гаплотип Ex4T детектирован только в комбинации с Ex4C. В связи с этим предполагается, что мутантный тип экзона-4 (Ex4T) ассоциирован с наличием не менее чем двух копий гена *VRN-A1* с альтернативным гаплотипом экзона-4 на геном. Все тетраплоидные образцы вне зависимости от вида характеризовались исключительно диким типом экзона-4 (Ex4C и Ex4C.f). В гексаплоидной пшенице с рецессивным аллелем *vrn-A1* образцы с единичным гаплотипом Ex4C встречались крайне

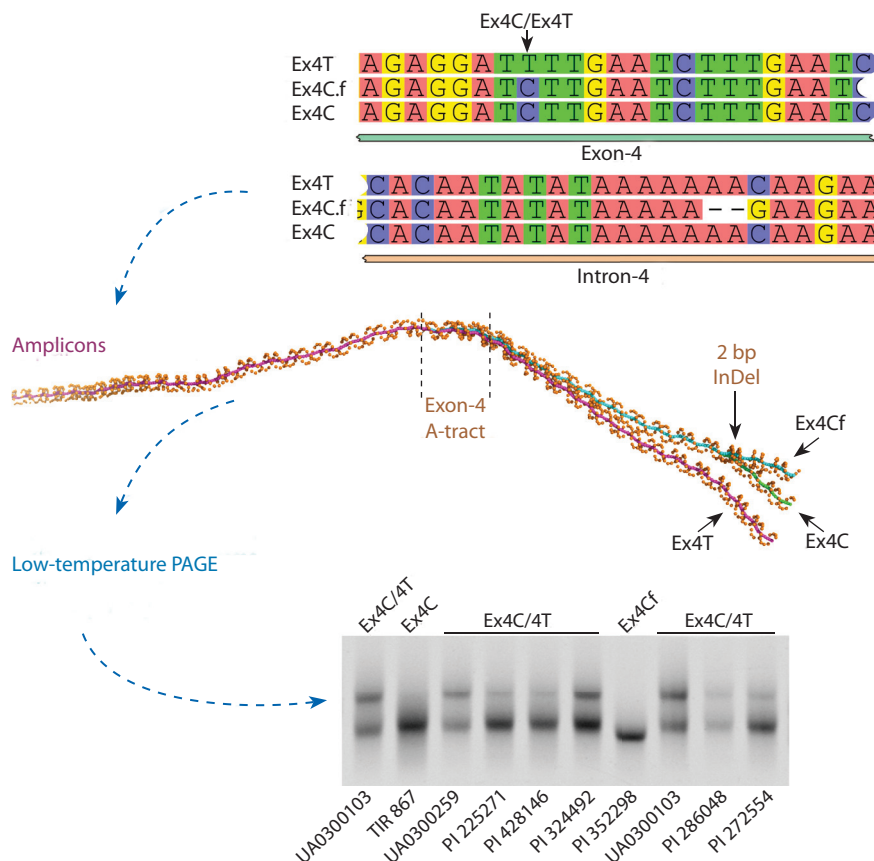


Fig. 1. Design of codominant markers for the *VRN-A1* exon-4 haplotypes based on changes in DNA molecule curvature.

редко и преобладали у вида *T. sphaerococcum*, а также в сортах *T. aestivum* из стран Западной Европы (Доп. материалы¹).

Новый аллель *Vrn-A1k* идентифицирован в тетраплоидной пшенице *T. dicoccum*. Согласно данным ДНК-маркерного анализа, образцы *T. dicoccum* (PI 191091 и PI 276015) несут доминантный аллель *Vrn-A1a.3* (Muterko et al., 2016), который содержит инсерцию мобильного генетического элемента в области промотора. Однако в настоящем исследовании установлено, что гаплотип Ex4C, идентифицированный в образцах PI 191091 и PI 276015 (GenBank: KU844093), не присущ аллелю *Vrn-A1a*, который характеризуется гаплотипом Ex4C.f. В связи с этим проведен анализ первичной структуры участка, охватывающего промотор, экзон-1 и частично интрон-1 гена *VRN-A1*, в данных образцах вида *T. dicoccum* (GenBank: KX874608). В результате анализа нуклеотидной последовательности ПЦР-фрагментов длиной около 760 п. н., полученных в ходе амплификации с парой праймеров VRN1AF и VRN1-INT1R, идентифицирована инсерция протяженностью 42 п. н. в области промотора гена *VRN-A1* (рис. 2).

Инсерция локализована в позиции –122 п. н. относительно предполагаемого для генов *VRN1* стартового кодона и не имеет аналогов среди известных аллелей гена *VRN-A1*. В структуре инсерции выделяется поли-А-тракт протяженностью 21 п. н., который фланкирован прямым повтором из 15 п. н. (CCCAACCACCTGATA), при этом повтор, локализованный со стороны 5'-конца, также фланкирован прямым повтором длиной 6 п. н. (TCCTCA) (см. рис. 2, в). Интересно, что прочтение последовательности, следующей сразу после поли-А-тракта, становится невозможным при чтении как с прямой, так и с обратной цепи вследствие наложения пиков флуоресценции на хромато-

¹ Дополнительные материалы см. в Приложении 1 по адресу: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2017-21/appx5.pdf>

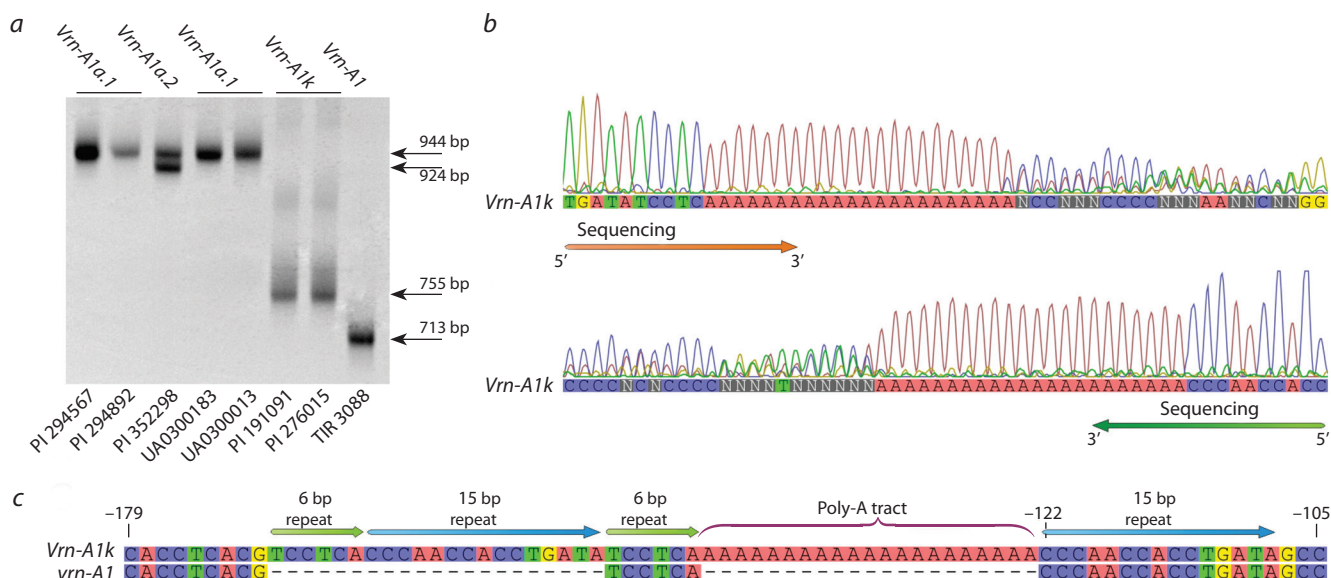


Fig. 2. Identification of the *Vrn-A1k* allele.

(a) PAGE of PCR fragments, obtained with primer pair VRN1AF/VRN1-INT1R in accessions carrying *Vrn-A1a*, *Vrn-A1k*, and *vrn-A1*. (b) DNA sequencing chromatograms of *Vrn-A1k*. (c) Insertion within the *Vrn-A1k* promoter region.

грамме (см. рис. 2, б). Это наблюдение свидетельствует о полиморфизме длины поли-А-тракта среди ампликонов. Действительно, при электрофорезе продуктов амплификации в ПАА гелях в месте локализации целевого фрагмента наблюдается шлейф, представленный фрагментами большей длины и их гетеродуплексами. Интересно, что минимальная длина поли-А-тракта в 21 п. н. соответствует двум виткам спирали ДНК, после чего следует дивергенция ампликонов.

По существующей номенклатуре, новый аллель обозначен как *Vrn-A1k*. Согласно паспортным данным, образцы PI 191091 и PI 276015 характеризуются яровым типом развития. Кроме того, ДНК-маркерный анализ не выявил в данных образцах доминантных аллелей генов *VRN-B1* и *VRN-B3* (Muterko et al., 2016). В связи с этим предполагается, что инсерция размером 42 п. н. в промоторе *Vrn-A1k* может быть ассоциирована со снижением потребности в яровизации и яровым типом развития пшеницы. Наконец, один из образцов *T. dicoccum* (PI 191091), несущий аллель *Vrn-A1k*, был выращен в тепличных условиях, в отсутствие яровизации, на удлинённом фотопериоде (24 ч) и генотипирован по генам *VRN-A1*, *VRN-B1* и *VRN-B3* с использованием ДНК-маркеров. В результате генотипирования не выявлено доминантных аллелей генов *VRN-B1* и *VRN-B3*. Время до колошения этого образца составило 92 дня, что хорошо согласуется со временем цветения, указанным в его паспорте (99 дней).

Идентификация гена *VRN-D4*. Ген *VRN-D4* представляет собой дубликацию гена *VRN-A1* в коротком плече хромосомы 5D, следовательно, он не характерен для тетраплоидных видов пшеницы, у которых D геном отсутствует. Доминантный и рецессивный аллели гена *VRN-D4* различаются по его присутствию или отсутствию соответственно.

Идентификацию гена *VRN-D4* осуществляли в ходе аллель-специфической ПЦР (АС-ПЦР) с прямым праймером Ex4F2m3 (используемым также в определении гаплотипа экзона-4) и аллель-специфическим обратным праймером V4/R2m3, разработанным к ОНП (C/A) в четвертом экзоне, по которому, согласно литературным данным, ген *VRN-D4* отличается от гена *VRN-A1* (Kippes et al., 2015). Целевой ПЦР-фрагмент 264 п. н., детектирующий *VRN-D4*, выявлен только у образцов вида *T. sphaerococcum* (за исключением образца C1tr 17737). Следовательно, идентифицированные в данных образцах гаплотипы экзона-4 включают в себя как гаплотипы гена *VRN-A1*, так и гаплотип гена *VRN-D4*, который отличается от гаплотипа Ex4C гена *VRN-A1* только одной трансверсией в экзоне-4 и не отличим от последнего при данных условиях анализа.

Дифференциация образцов с гаплотипом Ex4C по полиморфизму интрона-4 гена *VRN-A1*. Анализ интрона-4 выявил более 10 А-трактов, общая протяженность которых составляет около 30 % от его длины. Высокая плотность локализации А-трактов на данном участке повышает вероятность возникновения мутаций их первичной структуры. Изменение кривизны (формы) молекул ДНК, ассоциированное с полиморфизмом А-трактов, может быть впоследствии детектировано при электрофорезе в ПААГ. В связи с этим с целью повышения информативности ПЦР-анализа данного района гена *VRN-A1* и получения дополнительных гаплотипов участок амплификации был расширен в сторону 3'-конца на 200 п. н. Для этого был разработан специфичный к гену *VRN-A1* обратный праймер Ex4AR245m3 и проведена ПЦР в комбинации с праймером Ex4F2m3.

Электрофорез продуктов амплификации в ПАА геле идентифицировал пять целевых фрагментов ПЦР (рис. 3), соответствующих пяти различным гаплотипам

гена *VRN-A1* (GenBank: KX874600-KX874607). Выявлено расщепление гаплотипа Ex4C на четыре варианта (Ex4C.f, Ex4C.m, Ex4C.s, Ex4C.sph), которые могут быть четко различимы по изменению скорости миграции фрагментов ПЦР в ходе электрофореза в ПААГ. Анализ первичной структуры данных гаплотипов обнаружил полиморфизм А-тракта, локализованного в интроне-4. Минимальная длина А-тракта, равная 7 п. н., установлена для гаплотипов Ex4C.s и Ex4C.f. Гаплотипы Ex4C.m и Ex4C.sph характеризуются увеличением длины А-тракта до 8 и 9 п. н. соответственно. Длина А-тракта в гаплотипе Ex4T соответствует его продолжительности в гаплотипе Ex4C.m (8 п. н.).

Ускорение миграции ампликонов через ПАА гель, ассоциированное с увеличением длины А-тракта от 7 до 9 п. н., свидетельствовало об уменьшении кривизны соответствующих молекул ДНК (см. рис. 3). Кроме того, фрагменты, детектирующие гаплотип Ex4C.f, мигрировали на том же уровне, что и фрагменты Ex4C.sph. Оба полиморфных А-тракта в данных фрагментах (Ex4C.f и Ex4C.sph) локализованы приблизительно на одинаковом расстоянии от центра, а, следовательно, в случае равенства порождаемых ими углов изгиба будут оказывать одинаковое влияние на подвижность молекул ДНК. Таким образом, наблюдаемое изменение скорости миграции ПЦР-фрагментов альтернативных гаплотипов предполагает, что кривизна ДНК молекулы при длине А-тракта, равной 5 п. н., соответствует кривизне молекулы с длиной А-тракта, равной 9 п. н. Следовательно, можно утверждать, что максимальная кривизна А-тракта достигается, когда его длина равна 7 п. н., и пропорционально убывает при дальнейшем увеличении или уменьшении числа А-Т пар нуклеотидов (при одинаковом нуклеотидном окружении и идентичных условиях).

Дополнительно выявленные гаплотипы Ex4C.m и Ex4C.sph идентифицированы исключительно в гексаплоидной пшенице наряду с гаплотипами Ex4C.s, Ex4C.f и Ex4T, при этом гаплотип Ex4C.sph (GenBank: KX874600) обнаружен только в образцах *T. shaeerococcum* и только в комбинации с гаплотипом Ex4T (табл. 2).

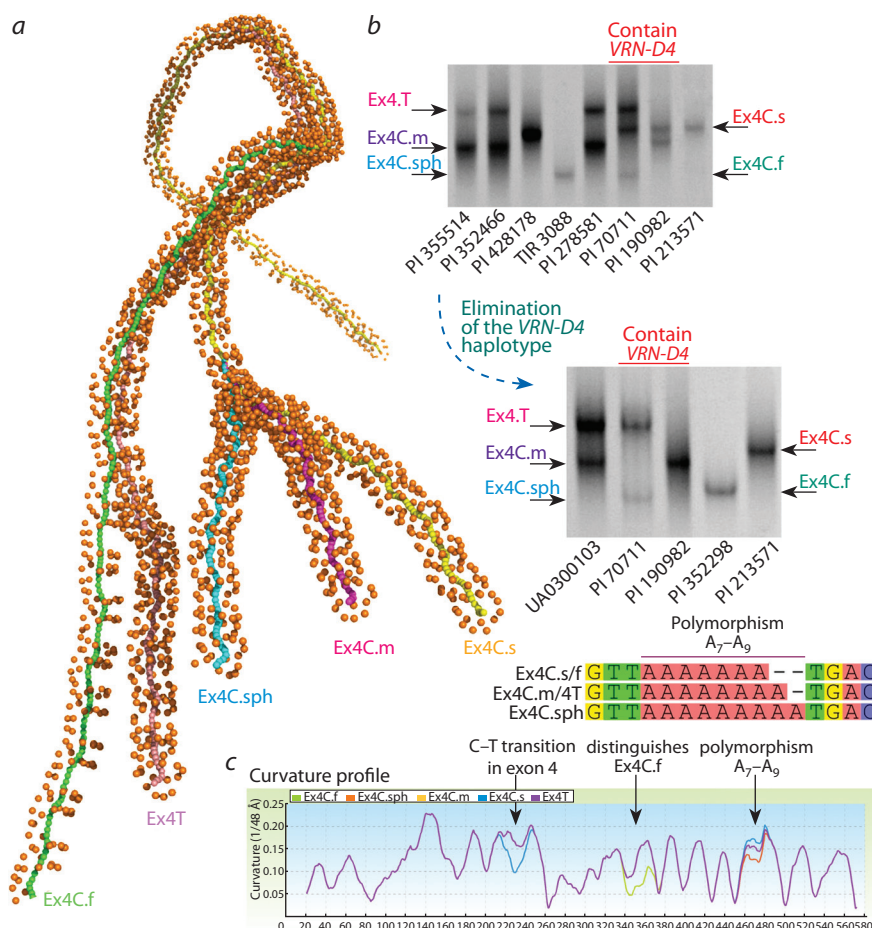


Fig. 3. The *VRN-A1* haplotypes identified by PCR with primer pair Ex4F2m3/Ex4AR245m3.

(a) Superposition of predicted paths of DNA molecules for *VRN-A1* exon-4 haplotypes. (b) Electrophoresis of PCR fragments of five *VRN-A1* and *VRN-D4* haplotypes. (c) Curvature profiles in the DNA molecules of alternative haplotypes.

Таким образом, гексаплоидная пшеница включает в себя полный набор анализируемых гаплотипов *VRN-A1*, при этом гаплотипы Ex4C.m и Ex4C.sph являются демаркационными по отношению к тетраплоидным видам пшеницы, а гаплотип Ex4C.sph выделяет вид *T. shaeerococcum* из гексаплоидных пшениц. В образцах, содержащих не менее двух копий гена *VRN-A1* с различным типом экзона-4 (Ex4C, Ex4T), гаплотип Ex4T был ассоциирован с гаплотипом Ex4C.m, но не наоборот, поскольку выявлены образцы гексаплоидной пшеницы вида *T. aestivum* (TRI 834, TRI 1948, TRI 3111) и *T. shaeerococcum* (PI 190982, PI 278650), несущие только гаплотип Ex4C.m гена *VRN-A1*. В связи с этим предполагается, что гаплотип Ex4T дивергировал из гаплотипа Ex4C.m.

Для определения гаплотипов гена *VRN-A1* в образцах *T. shaeerococcum* (PI 277142, PI 70711, PI 324492, PI 190982 и PI 278650), несущих ген *VRN-D4* и детектирующих два и более ампликона с различной скоростью миграции в ПАА гелях (гаплотипы Ex4C.sph, Ex4Cs и Ex4T в образцах PI 277142, PI 70711, PI 324492, и гаплотипы Ex4C.m и Ex4Cs в образцах PI 190982, PI 278650), был разработан аллель-специфический праймер Ex4FoutV4, исключающий амплификацию последовательности гена *VRN-D4* вследствие частичной потери комплементарности 3'-конца праймера с ДНК-матрицей, что обусловлено наличием ОНП и искусственно введенного некомплементарного нуклеотида (мисмэтча). Несмотря на то, что последовательность праймера, идентичная участку гена *VRN1* из А генома (за исключением искусственного мисмэтча),

Table 2. Occurrence of exon 4 haplotypes in polyploid wheat accessions carrying different *VRN-A1* alleles

Allele	<i>VRN-A1</i> exon 4 haplotype	Tetraploid wheat	Hexaploid wheat
<i>vrn-A1</i>	Ex4C.f	2	2
	Ex4C.m	0	5
	Ex4C.s	10	8
	Ex4C.sph/4T	0	3
	Ex4C.m/4T	0	46
	Ex4T	0	1
<i>Vrn-A1a</i>	Ex4C.f	2	6
<i>Vrn-A1b.1-6</i>	Ex4C.s	35	11
<i>Vrn-A1e</i>	Ex4C.f	3	0
<i>Vrn-A1i</i>	Ex4C.f	5	0
<i>Vrn-A1k</i>	Ex4C.s	2	0
<i>Vrn-A1c</i> (Langdon)	Ex4C.s	17	0

отличается от аналогичных участков этого гена из В и D геномов пшеницы только двумя ОНП, локализованными вблизи центра праймера, продукты амплификации гена *VRN1* из В и D геномов при использовании общего для трех геномов обратного праймера не наблюдались даже при температуре отжига ниже 56 °С. Тем не менее Ex4FoutV4 был применен в комбинации с обратным праймером Ex4AR, который специфичен к гену *VRN-A1*. Анализ продуктов амплификации в ПААГ не выявил фрагментов, детектирующих гаплотип Ex4C.s (см. рис. 3). Следовательно, ген *VRN-A1* в образцах *T. shaerococcum* PI 277142, PI 70711 и PI 324492 представлен вариантами с гаплотипами Ex4C.sph и Ex4T, тогда как образцы PI 190982 и PI 278650 несут гаплотип Ex4C.m гена *VRN-A1*, а гаплотип Ex4Cs в данных образцах принадлежит гену *VRN-D4*. Кроме того, локализация прямого праймера Ex4FoutV4 приводит к смещению локального изгиба молекулы ДНК, индуцируемого полиморфным А-трактом (A₇–A₉), ближе к центру фрагмента, что сопровождается более симметричным распределением глобальной кривизны молекулы. Предполагается, что симметричная кривизна сглаживает зависимость силы сопротивления гелевой матрицы от ориентации молекулы. Поэтому скорость миграции молекул ДНК для фрагментов, детектирующих гаплотип Ex4C.f, у которых изгиб в области данного А-тракта больше, чем у ампликонов Ex4C.sph, снижается.

Обсуждение

В нашем предыдущем исследовании участка промотора гена *VRN-A1* были оптимизированы условия для наблюдения конформационного полиморфизма ДНК, что позволило дискриминировать аллельные варианты, различающиеся между собой по ОНП в пределах аденинового тракта (Muterko et al., 2016). В настоящем исследовании модуляция кривизны молекул ДНК, обусловленная полиморфизмом А-трактов, взята за основу для разработки особого типа кодоминантных ДНК-маркеров, позволяющих в ходе одной реакции качественно различить альтернативные аллели, представленные в различных копиях данного гена.

Известно, что относительная подвижность изогнутых молекул ДНК через ПАА гель линейно зависит от квадрата их кривизны (Koo et al., 1988). Следовательно, для фрагментов ДНК одинаковой длины можно получить существенную разницу в скорости миграции, достаточную для их достоверного разграничения в ходе анализа, если их кривизна будет модулирована с максимальной амплитудой. Пару праймеров для проведения ПЦР подбирали таким образом, чтобы полиморфный А-тракт располагался вблизи центра целевых фрагментов, что обеспечивает оптимальную амплитуду модуляции глобальной кривизны и скорости миграции соответствующих молекул ДНК через ПАА гель. Смещение локального изгиба, индуцированного А-трактом, к центру молекулы ДНК приводит к ее более симметричному глобальному изгибу и сглаживанию зависимости силы сопротивления гелевой матрицы от ориентации молекулы. Кроме того, поскольку замедление молекул ДНК в геле находится в экспоненциальной зависимости от их длины, то вероятно, что для фрагментов большей длины изменение кривизны их молекул оказывает более сильное влияние на изменение скорости миграции через ПАА гель. Увеличение размера анализируемого участка значительно повысило информативность анализа и привело к насыщению выборки дополнительными гаплотипами гена *VRN-A1*. В результате было получено расщепление по гаплотипу среди образцов, характеризующихся только одним, диким, типом экзона-4 гена *VRN-A1*. Кроме того, увеличилась разница в скорости миграции альтернативных гаплотипов, что позволило более точно идентифицировать фрагменты ПЦР, детектирующие гаплотип Ex4C.f. Благодаря дополнительно выявленному гаплотипу Ex4C.m, удалось установить филогенетическую линию, в которой дивергировал гаплотип Ex4T и произошло двухэтапное событие мультипликации гена *VRN-A1* в две, а затем три копии последовательно.

В настоящее время предложено несколько ДНК-маркеров, идентифицирующих гаплотипы экзона-4 и 7 гена *VRN-A1*, большинство из них основаны на методе рестрикционного анализа фрагментов ПЦР (Chen et al., 2009; Eagles et al., 2011; Li et al., 2013; Yan et al., 2015). В неко-

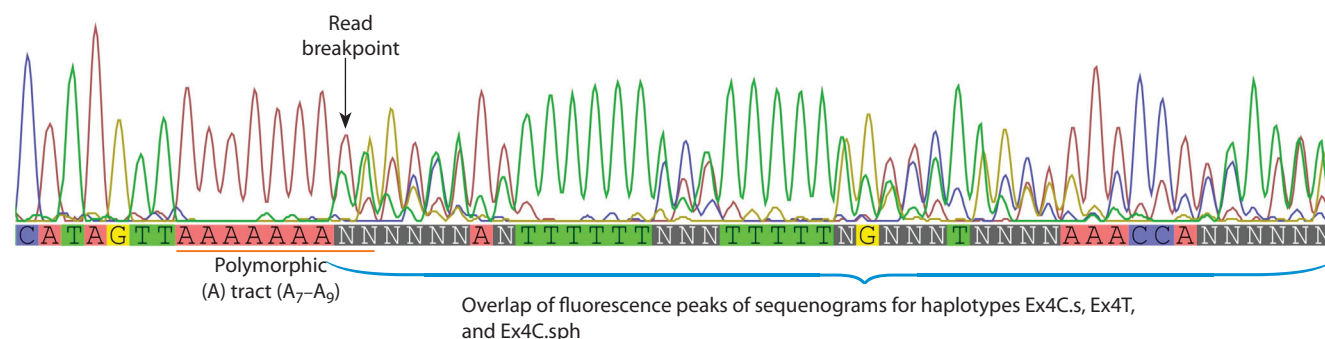


Fig. 4. Part of DNA sequencing chromatogram of PCR products obtained with primer pair Ex4F2m3/Ex4AR245m3 for *T. sphaerococcum* accession PI 70711.

The position of breakpoint of reading of the DNA sequence arising from the overlap of fluorescence peaks of three different *VRN-A1* and *VRN-D4* haplotypes is indicated.

торых исследованиях гаплотип экзона-4 выявляли в ходе анализа хроматограмм секвенирования соответствующих ампликонов (Zhang et al., 2015) или субклонов (Chen et al., 2013), а также с использованием KASP-генотипирования (Díaz et al., 2012). В отличие от предложенных в настоящем исследовании способов, они более трудоемкие, экономически затратные и требуют больше времени для получения результата, поскольку содержат большее число этапов анализа. В большинстве случаев маркеры являются доминантными. Кроме того, они не позволяют определить предполагаемое соотношение копий с альтернативным гаплотипом экзона-4. С их помощью не представляется возможным выполнить все вышеизложенное с поправкой на присутствие гена *VRN-D4* или доминантного аллеля *VRN-A1* в гетерозиготных образцах.

Исследование полиморфизма экзона-4 осложняется наличием нескольких копий гена *VRN-A1* с различными гаплотипами в разных соотношениях. В предыдущих исследованиях идентификация образцов, несущих одновременно дикий и мутантный типы четвертого экзона, проводилась по наличию двойного пика на хроматограмме секвенирования (Díaz et al., 2012; Zhang et al., 2015). Однако не всегда удается четко отличить такую область хроматограммы от шума, особенно в случаях, где число копий с различными гаплотипами экзона-4 неодинаково. Кроме того, как было показано в настоящем исследовании, наличие в одной из копий хотя бы 1 п. н. делеции/инсерции приводит к невозможности дальнейшего прочтения хроматограммы секвенирования вследствие наложения пиков флуоресценции фрагментов разной длины и требует разбиения последовательности на несколько частей, при этом участок локализации делеции/инсерции выпадает из анализа. На рис. 4 проиллюстрирована часть хроматограммы, которая охватывает участок локализации полиморфного А-тракта (A_7-A_9) в интроне-4 гена *VRN-A1* полученных в ходе секвенирования продуктов амплификации с парой праймеров Ex4F2m3 и Ex4AR245m3 образца *T. sphaerococcum* (PI 70711), несущего три альтернативных гаплотипа и ген *VRN-D4*. Из рис. 4 видно, что полиморфизм А-тракта (A_7-A_9) приводит к смешению пиков флуоресценции из разных копий и в результате к наложению и перекрыванию их спектров, это делает невозможным

прочтение первичной структуры после сайта локализации делеции. Наконец, секвенирование требует больше времени на пробоподготовку и проведение самой процедуры.

Анализируемый в настоящем исследовании участок гена *VRN-A1* является относительно консервативным между гомеологичными генами *VRN1*, что требовало разработку особого типа праймеров к однонуклеотидному полиморфизму и оптимизацию ПЦР для получения целевых фрагментов. Аллель-специфические праймеры Ex4F2m3, V4/R2m3, Ex4outV4F2m3 и Ex4AR245m3 были разработаны таким образом, что ОНП-мутация, различающая гомеологичные гены *VRN1*, а также ген *VRN-D4*, локализована во второй позиции относительно 3'-конца праймера. Кроме того, искусственное нарушение комплементарности было создано в позиции 3 (от 3'-конца) для дополнительной дестабилизации двойной спирали ДНК при условии отсутствия комплементарности в соседней позиции 2. Искусственно введенный, некомплементарный, нуклеотид подбирался исходя из окружающей его нуклеотидной последовательности и в соответствии с данными о влиянии типа некомплементарной пары нуклеотидов на стабильность двойной спирали (Liu et al., 2012). Предполагается, что присутствие неспаренного нуклеотида во второй позиции от 3'-конца праймера приводит к расплетению спирали ДНК, которое охватывает три нуклеотида (с 1-го по 3-й нуклеотид от 3'-конца праймера), исключая тем самым возможность элонгации цепи ДНК-полимеразой. Если же ДНК-матрица содержит нуклеотид, комплементарный нуклеотиду во второй позиции от 3'-конца праймера, то единственная некомплементарная пара в позиции 3 (от 3'-конца) не оказывает значительного влияния на эффективность отжига праймера и возможность последующей его элонгации в ходе ПЦР (Liu et al., 2012). В ходе ПЦР-анализа с участием любого из аллель-специфических праймеров не выявлено нецелевых продуктов реакции, обусловленных амплификацией альтернативных аллелей, различающихся по ОНП в сайте отжига праймера. В связи с этим предполагается, что локализация ОНП во второй позиции и введение искусственного некомплементарного нуклеотида в третью позицию относительно 3'-конца могут стать общим правилом при разработке аллель-специфических праймеров

для маркирования однонуклеотидного полиморфизма вне зависимости от объекта исследования.

В предыдущих исследованиях полиморфизм экзона-4 гена *VRN-A1* анализировали в небольшой выборке образцов одного вида гексаплоидной пшеницы (*T. aestivum*). В настоящей работе не только расширено количество видов гексаплоидной пшеницы, но также добавлены и широко распространенные тетраплоидные виды. В результате удалось охватить все наиболее часто привлекаемые в селекцию виды полиплоидной пшеницы, а также все встречающееся в них разнообразие аллелей гена *VRN-A1*. В ходе анализа 11 видов пшеницы идентифицирован лишь один образец, который несет мутантный экзон-4 (гаплотип Ex4T) в одиночном представлении. В связи с этим нельзя исключить вероятность того, что данный образец является мутантом, в котором одна из копий гена *VRN-A1* содержит изменения в первичной структуре анализируемого участка. Во всех остальных случаях гаплотип Ex4T выявлен только в комбинации с гаплотипом Ex4C.m и только в образцах гексаплоидной пшеницы с интактным промотором и интроном-1 гена *VRN-A1* (рецессивный аллель *vrn-A1*). Следовательно, можно утверждать, что полиморфизм А-тракта в четвертом экзоне *VRN-A1* наблюдается исключительно в образцах гексаплоидной пшеницы, содержащих не менее двух копий этого гена. Кроме того, скрининг доступных в GenBank последовательностей экзона-4 гена *VRN-A1* выявил гаплотип Ex4C.s в образцах диплоидной пшеницы видов *T. monococcum* и *T. urartu*, что также подтверждает его более раннее происхождение и характеризует как дикий тип, в то время как мутантный гаплотип Ex4T дивергировал после аллополиплоидизации из рецессивного аллеля *vrn-A1* с гаплотипом Ex4C.m в гексаплоидной пшенице. Таким образом, в образцах гексаплоидной пшеницы, детектирующих гаплотип Ex4T, присутствие гена *VRN-D4* или доминантного аллеля *VRN-A1* в гетерозиготе может быть установлено по наличию специфического для них гаплотипа Ex4C.s (или Ex4C.f для аллеля *Vrn-A1a*).

Ранее было показано, что *Vrn-A1a* и *Vrn-A1b* имеют гаплотип Ex4C (Eagles et al., 2011). Тем не менее в литературных источниках отсутствуют данные о полиморфизме экзона-4 в большинстве других аллелей гена *VRN-A1*. Тогда же было высказано предположение, что аллели *Vrn-A1a* и *Vrn-A1b* имеют общего ближайшего предка с интактным промотором гена *VRN-A1* (Eagles et al., 2011). В настоящем исследовании установлено, что все доминантные аллели гена *VRN-A1* имеют гаплотип дикого типа Ex4C.s или Ex4C.f. Кроме того, показано, что, несмотря на то, что аллели *Vrn-A1a* и *Vrn-A1b* характеризуются идентичными последовательностями экзона-4, происходят они из разных филологических линий, узлы которых представлены гаплотипами Ex4C.s и Ex4C.f соответственно.

Недавнее исследование более 1100 озимых сортов мягкой пшеницы показало, что только около 7 % несут одну копию *VRN-A1*, тогда как подавляющее большинство сортов содержат практически с равной вероятностью две или три копии этого гена, и только в трех сортах (0.3 %) детектировано четыре копии *VRN-A1* (Würschum et al., 2015). Однако оно проводилось без учета присутствия гена *VRN-D4*, следовательно, нельзя утверждать, что в сортах,

для которых выявлено четыре копии гена *VRN-A1*, одна из копий не является геном *VRN-D4*, поскольку участок ДНК, анализируемый для определения числа копий, идентичен для обоих генов. В настоящем исследовании среди образцов гексаплоидной пшеницы с рецессивным аллелем *vrn-A1* 75 % образцов несли одновременно оба, дикий и мутантный, типа экзона-4 (Ex4C/Ex4T), следовательно, обладали не менее чем двумя копиями гена *VRN-A1*. Образцы с предположительно одной копией рецессивного аллеля *vrn-A1* (гаплотипы Ex4C.f, Ex4C.s или Ex4C.m) идентифицированы главным образом в образцах вида *T. sphaerococcum*, а также в сортах *T. aestivum* из стран Западной Европы, что согласуется с результатами исследования (Würschum et al., 2015) по распространению сортов мягкой пшеницы *T. aestivum* с различной копийностью гена *VRN-A1*.

Поскольку в данной работе установлено, что дикий тип экзона-4 (гаплотип Ex4C) характерен для гена *VRN-D4*, гена *VRN-A1* в тетраплоидной и, вероятно, диплоидной пшенице, а также для известных доминантных аллелей *VRN-A1*, то необходимость в идентификации гаплотипов экзона-4 существует только для гексаплоидной пшеницы, несущей рецессивный аллель *vrn-A1*.

В нашем предыдущем исследовании генов *VRN1* в гексаплоидных и тетраплоидных видах пшеницы, согласно результатам ДНК-маркерного анализа, аллель *Vrn-A1a.3* был ошибочно идентифицирован в образцах *T. dicoccum* PI 191091 и PI 276015 (Muterko et al., 2016). Однако установленные в этой работе ассоциации между гаплотипами и аллелями гена *VRN-A1* поставили под сомнение ранее полученные результаты. Анализ первичной структуры фрагментов ПЦР данных образцов *T. dicoccum* выявил новый аллель, *Vrn-A1k*, характеризующийся инсерцией длиной 42 п. н. в области промотора гена *VRN-A1*. Инсерция локализована на участке, который не перекрывается мутациями, идентифицированными в известных аллелях гена *VRN-A1*, что повышает значимость аллеля *Vrn-A1k* в исследовании локализации регуляторных сайтов и анализе влияния полиморфизма различных участков промотора на транскрипционную активность генов *VRN1*. Согласно паспортным данным, образцы PI 191091 и PI 276015 относятся к яровым. Кроме того, в данных образцах не обнаружено доминантных аллелей генов *VRN-B1* и *VRN-B3* (Muterko et al., 2016). Это дает основание предположить, что аллель *Vrn-A1k* обуславливает яровой тип развития. Хотя генетический анализ будет необходим для подтверждения связи между присутствием аллеля *Vrn-A1k* и отсутствием потребности в яровизации, тем не менее наличие в данных образцах гипотетических генов, не аллельных *VRN*, но с сопоставимым влиянием на отзывчивость к яровизации кажется мало вероятным.

Acknowledgments

This work was supported by the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, integrated program II.2, project 0324-2015-0015.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Chen F., Gao M., Zhang J., Zuo A., Shang X., Cui D. Molecular characterization of vernalization and response genes in bread wheat from the Yellow and Huai Valley of China. *BMC Plant Biol.* 2013;13:199. DOI 10.1186/1471-2229-13-199.
- Chen Y., Carver B.F., Wang S., Zhang F., Yan L. Genetic loci associated with stem elongation and winter dormancy release in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2009;118(5):881-889. DOI 10.1007/s00122-008-0946-5.
- Danyluk J., Kane N.A., Breton G., Limin A.E., Fowler D.B., Sarhan F. TaVRT-1, a putative transcription factor associated with vegetative to reproductive transition in cereals. *Plant Physiol.* 2003;132(4):1849-1860. DOI 10.1104/pp.103.023523.
- Dhillon T., Pearce S.P., Stockinger E.J., Distelfeld A., Li C., Knox A.K., Vashegyi I., Vágújfalvi A., Galiba G., Dubcovsky J. Regulation of freezing tolerance and flowering in temperate cereals: the *VRN-1* connection. *Plant Physiol.* 2010;153(4):1846-1858. DOI 10.1104/pp.110.159079.
- Díaz A., Zikhali M., Turner A.S., Isaac P., Laurie D.A. Copy number variation affecting the *Photoperiod-B1* and *Vernalization-A1* genes is associated with altered flowering time in wheat (*Triticum aestivum*). *PLoS ONE.* 2012;7(3):e33234. DOI 10.1371/journal.pone.0033234.
- Diekmann S. Analyzing DNA curvature in polyacrylamide gels. *Methods Enzymol.* 1992;212:30-46. DOI 10.1016/0076-6879(92)12004-A.
- Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 1987;19:11-15.
- Eagles H.A., Cane K., Trevaskis B. Veery wheats carry an allele of *Vrn-A1* that has implications for freezing tolerance in winter wheats. *Plant Breeding.* 2011;130:413-418. DOI 10.1111/j.1439-0523.2011.01856.x.
- Fu D., Szucs P., Yan L., Helguera M., Skinner J., Hayes P., Dubcovsky J. Large deletions within the first intron in *VRN-1* are associated with spring growth habit in barley and wheat. *Mol. Gen. Genomics.* 2005;273(4):54-65. DOI 10.1007/s00438-004-1095-4.
- Kippes N., Debernardi J.M., Vasquez-Gross H.A., Akpinar B.A., Budak H., Kato K., Chao S., Akhunov E., Dubcovsky J. Identification of the *VERNALIZATION 4* gene reveals the origin of spring growth habit in ancient wheats from South Asia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015;112(39):E5401-E5410. DOI 10.1073/pnas.1514883112.
- Koo H.S., Crothers D.M. Calibration of DNA curvature and a unified description of sequence-directed bending. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988;85:1763-1767.
- Koo H.S., Wu H.M., Crothers D.M. DNA bending at adenine-thymine tracts. *Nature.* 1986;320(6062):501-506. DOI 10.1038/320501a0.
- Li G., Yu M., Fang T., Cao S., Carver B.F., Yan L. Vernalization requirement duration in winter wheat is controlled by TaVRN-A1 at the protein level. *Plant J.* 2013;76(5):742-753. DOI 10.1111/tpj.12326.
- Liu J., Huang S., Sun M., Liu S., Liu Y., Wang W., Zhang X., Wang H., Hua W. An improved allele-specific PCR primer design method for SNP marker analysis and its application. *Plant Methods.* 2012;8(1):34. DOI 10.1186/1746-4811-8-34.
- Lupas A., Van Dyke M., Stock J. Predicting coiled coils from protein sequences. *Science.* 1991;252(5009):1162-1164. DOI 10.1126/science.252.5009.1162.
- Marini J.C., Levene S.D., Crothers D.M., Englund P.T. Bent helical structure in kinetoplast DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1982;79(24):7664-7668.
- Muterko A., Kalendar R., Cockram J., Balashova I. Discovery, evaluation and distribution of haplotypes and new alleles of the *Photoperiod-A1* gene in wheat. *Plant Mol. Biol.* 2015;88(1-2):149-164. DOI 10.1007/s11103-015-0313-2.
- Muterko A., Kalendar R., Salina E. Novel alleles of the *VERNALIZATION1* genes in wheat are associated with modulation of DNA curvature and flexibility in the promoter region. *BMC Plant Biol.* 2016;16(1):9. DOI 10.1186/s12870-015-0691-2.
- Santelli E., Richmond T.J. Crystal structure of MEF2A core bound to DNA at 1.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 2000;297(2):437-449. DOI 10.1006/jmbi.2000.3568.
- Treisman R. The serum response element. *Trends Biochem. Sci.* 1992;17(10):423-426. DOI 10.1016/0968-0004(92)90013-Y.
- Würschum T., Boeven P.H., Langer S.M., Longin C.F., Leiser W.L. Multiply to conquer: Copy number variations at *Ppd-B1* and *Vrn-A1* facilitate global adaptation in wheat. *BMC Genet.* 2015;29:16-96. DOI 10.1186/s12863-015-0258-0.
- Yan L., Fu D., Li C., Blechl A., Tranquilli G., Bonafede M. The wheat and barley vernalization gene *VRN3* is an orthologue of *FT*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006;103(51):19581-19586. DOI 10.1073/pnas.0607142103.
- Yan L., Helguera M., Kato K., Fukuyama S., Sherman J., Dubcovsky J. Allelic variation at the VRN1 promoter region in polyploid wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2004a;109(8):1677-1686. DOI 10.1007/s00122-004-1796-4.
- Yan L., Li G., Yu M., Fang T., Cao S., Carver B.F. Genetic mechanisms of vernalization requirement duration in winter wheat cultivars. *Advances in Wheat Genetics: From Genome to Field.* Eds. Y. Ogihara, S. Takumi, H. Handa. 2015;13:117-125. DOI 10.1007/978-4-431-55675-6_13.
- Yan L., Loukoianov A., Blechl A., Tranquilli G., Ramakrishna W., SanMiguel P., Bennetzen J., Echenique V., Dubcovsky J. The wheat *VRN2* gene is a flowering repressor down-regulated by vernalization. *Science.* 2004b;303(5664):1640-1644. DOI 10.1126/science.1094305.
- Yan L., Loukoianov A., Tranquilli G., Helguera M., Fahima T., Dubcovsky J. Positional cloning of the wheat vernalization gene *VRN1*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003;100(10):6263-6268. DOI 10.1073/pnas.0937399100.
- Yang Y., Jack T. Defining subdomains of the K domain important for protein-protein interactions of plant MADS proteins. *Plant Mol. Biol.* 2004;55:45-59. DOI 10.1007/s11103-004-0416-7.
- Zhang X., Gao M., Wang S., Chen F., Cui D. Allelic variation at the vernalization and photoperiod sensitivity loci in Chinese winter wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.). *Front. Plant Sci.* 2015;6:470. DOI 10.3389/fpls.2015.00470.

Идентификация и характеристика мРНК генов рецептор-подобных киназ MhyGSO1 и MhyGSO2 в паразитическом растении *Monotropa hypopitys* на стадии цветения

А.В. Щенникова , Е.З. Кочиева, А.В. Белецкий, М.А. Филюшин, О.А. Шульга, Н.В. Равин, К.Г. Скрябин

Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

В процессе формирования органов растения баланс программированного деления и позиционной дифференцировки клеток поддерживается за счет межклеточного обмена сообщениями с помощью сигнальных молекул, избирательно узнаваемых рецепторами. Среди последних паралоги GASSHO1 и GASSHO2 – киназы с лейцин-богатыми повторами, участвующие в регуляции идентичности и функционирования различных клеток корня и эпидермиса. Гены GASSHO охарактеризованы главным образом в *Arabidopsis thaliana*. Их несомненная значимость в сочетании с консервативностью базовых процессов онтогенеза придает изучению киназ GASSHO у других видов растений, отличающихся типом питания и нетрадиционным развитием, особую актуальность. Целью работы была идентификация генов GASSHO у представителя покрытосеменных, поддельника *Monotropa hypopitys*, который является бесхлорофильным микогетеротрофом. В результате проведенного поиска среди данных секвенирования транскриптомов различных тканей (корни с адвентивными почками, прицветники и цветки) двух индивидуальных растений, находящихся на стадии позднего цветения, были идентифицированы неполные последовательности мРНК двух паралогичных генов *MhyGASSHO1* (*MhyGSO1*) и *MhyGSO2*. Структурный анализ кодируемых ими неполных аминокислотных последовательностей выявил консервативные домены, характерные для рецепторных киназ с лейцин-богатыми повторами, в последовательности *MhyGSO1* и N-концевой лейцин-богатый домен в последовательности *MhyGSO2*. Филогенетический анализ белков *MhyGSO1* и *MhyGSO2* подтвердил их гомологию с киназами GSO1 и GSO2 у представителей Rosids и Asterids. При этом ближайшими гомологами белков *MhyGSO1* и *MhyGSO2* оказались киназы GSO1 и GSO2 у представителей порядка Solanales (Asterids). Количественный анализ транскриптов *MhyGSO1* и *MhyGSO2* выявил экспрессию обоих генов в цветках и прицветниках, а гена *MhyGSO1* – также в корнях с почками. Характер экспрессии исследуемых генов в совокупности с известными данными о генах GSO1 и GSO2 (*A. thaliana*) предполагает взаимодополняющую деятельность паралогов GASSHO в сигнальных путях развития поддельника, в частности в ответе на экзогенную сахарозу и в развитии репродуктивных органов и эмбриональных соцветий.

Ключевые слова: *Monotropa hypopitys*; микогетеротроф; транскриптом; рецепторные киназы; GASSHO; межклеточная сигнализация; апикальная меристема; ствольные клетки; эмбриогенез; эпидермис.

Identification and characterization of mRNAs of receptor-like kinases MhyGSO1 and MhyGSO2 in flowering parasitic plant *Monotropa hypopitys*

A.V. Shchennikova , E.Z. Kochieva, A.V. Beletsky, M.A. Filyushin, O.A. Shulga, N.V. Ravin, K.G. Skryabin

Institute of Bioengineering, Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" RAS, Moscow, Russia

Plant organ formation is based on the balance of the programmed cell division and positional differentiation maintained by intercellular communication mediated by signaling molecules and receptors. In *Arabidopsis thaliana*, two paralogous leucine-rich repeat receptor-like kinases, GASSHO1 and GASSHO2, redundantly participate in the regulation of various root cells identity and functioning and the proper epidermis patterning. The GASSHO genes are characterized mainly in *A. thaliana*. Their significance in combination with the conservation of basic developmental processes justifies the study of GASSHO kinases in other plant species with different nutrition and developmental features. The aim of this work was to identify the GASSHO genes in an angiosperm plant, pinesap *Monotropa hypopitys*, which is a non-photosynthetic achlorophyllous mycoheterotroph. In different tissues (roots with buds, bracts, and flowers) of two individual plants at the late flowering stage, the transcriptomic data search identified 3'-partial mRNAs of two paralogous genes, *MhyGASSHO1* (*MhyGSO1*) and *MhyGSO2*. Structural analysis of the encoded amino acid sequences revealed conserved domains, specific for leucine-rich repeat receptor-like kinases, in *MhyGSO1*, and the N-terminal leucine-rich domain in *MhyGSO2*. Phylogenetic analysis of *MhyGASSHOs* confirmed their homology with GSO1 and GSO2 kinases of the Rosids and Asterids representatives. The closest homologues of *MhyGSO1* and *MhyGSO2* were GSO1 and GSO2, respectively, of the Solanales members (Asterids). Quantification of the *MhyGSO1* and *MhyGSO2* transcripts revealed expression of both genes in flowers and bracts, and *MhyGSO1* – also in roots with buds. In combination with known data about GSO1 and GSO2, it allowed us to assume the redundant activity of *MhyGASSHO* paralogues

in signaling pathways, in particular, in response to exogenous sucrose and in development of reproductive organs and embryonic inflorescences.

Key words: *Monotropa hypopitys*; mycoheterotroph; transcriptome; receptor-like kinases; GASSHO; intercellular signaling; apical meristem; stem cells; embryogenesis; epidermis.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Щенникова А.В., Кочиева Е.З., Белецкий А.В., Филюшин М.А., Шульга О.А., Равин Н.В., Скрябин К.Г. Идентификация и характеристика мРНК генов рецептор-подобных киназ MhyGSO1 и MhyGSO2 в паразитическом растении *Monotropa hypopitys* на стадии цветения. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(3):334-340. DOI 10.18699/VJ17.250

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Shchennikova A.V., Kochieva E.Z., Beletsky A.V., Filyushin M.A., Shulga O.A., Ravin N.V., Skryabin K.G. Identification and characterization of mRNAs of receptor-like kinases MhyGSO1 and MhyGSO2 in flowering parasitic plant *Monotropa hypopitys*. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(3):334-340. DOI 10.18699/VJ17.250

В течение жизни растение постоянно находится в процессе формирования новых органов, балансируя между запрограммированным клеточным делением и позиционной дифференцировкой клеток. Источником строительного материала служат популяции ствольных клеток в апикальных меристемах побега и корня, которые закладываются с первых стадий развития зародыша (Aichinger et al., 2012). Функционирование этих клеток осуществляется за счет обмена сообщениями через клеточные мембраны с помощью сигнальных молекул, избирательно узнаваемых рецепторами (Takayama, Sakagami, 2002). Одними из таких рецепторов являются рецепторные киназы (RLK), составляющие около 60 % семейства киназ в модельном растении *Arabidopsis thaliana*. Большая их часть – это киназы с повторами, богатыми лейцином (LRR-RLK) (Shiu, Bleecker, 2003). Белки LRR-RLK участвуют в регуляции многих аспектов развития растения. В *A. thaliana*, например, ERECTA (ER) оказывает влияние на форму органов и архитектуру соцветия (Torii et al., 1996; Yokoyama et al., 1998), CLAVATA1 (CLV1) – на баланс между самообновлением и дифференцировкой ствольных клеток (Schoof et al., 2000), HAESA – на инициацию созревания цветковых органов (Jinn et al., 2000), RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE 2 (RPK2) – на развитие пыльника (Mizuno et al., 2007). Кроме того, киназы LRR-RLK играют существенную роль в инициации образования и структуризации эпидермиса, от чего зависят успешное эмбриональное развитие и жизнеспособность проростка (Javelle et al., 2011).

На сегодняшний день известны некоторые регуляторы механизма формирования кутикулы (Abe et al., 2003; Aharoni et al., 2004; Hooker et al., 2007; Moussu et al., 2013; De Giorgi et al., 2015; Fiume et al., 2016). Киназы LRR-RLK, RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE 1 (RPK1) и TOADSTOOL 2 (TOAD2) поддерживают идентичность центрального домена протодермальных клеток во время эмбриогенеза (Nodine, Tax, 2008). На ранней стадии развития зиготы дифференцировка эпидермальных клеток зависит от активности факторов транскрипции ARABIDOPSIS THALIANA MERISTEM L1 (ATML1) и PROTODERMAL FACTOR2 (PDF2), выключение которых приводит к потере идентичности эпидермальных клеток и нежизнеспособности эмбриона (Abe et al., 2003). Кроме ATML1 и PDF2, обратная сигнальная петля включает также рецепторную киназу ARABIDOPSIS CRINKLY4

(ACR4), координируя поддержание эпидермальной идентичности во внешнем клеточном слое эмбриона (Moussu et al., 2013). На более поздней, глобулярной стадии развития, когда эндосперм начинает накапливать целлюлозу, активируется второй сигнальный путь, включающий рецепторные киназы GASSHO1 (GSO1) и GASSHO2 (GSO2), а также эндосперм-специфичный субтилизин ABNORMAL LEAF SHAPE1 (ALE1) (Tsuwamoto et al., 2008). Данный путь опосредует усиление развития эмбриональной кутикулы, герметизируя эмбрион и стабилизируя эпидермальную идентичность клеток (Moussu et al., 2013; San-Bento et al., 2014). Одновременное выключение генов *GSO1* и *GSO2* ведет к искривлению зародышей и высокой проницаемости кутикулы, а также к слипанию семядолей и аномальному распространению устьиц на семядолях в зародыше и в проростке (Tsuwamoto et al., 2008).

В апикальной корневой меристеме эпидермис на кончике корня формируется потомством инициалей колумеллы корневого чехлика в проксимальной меристеме (Campilho et al., 2006), над которой находится покоящийся центр (ПЦ, или QC) – группа из нескольких редко делящихся ствольных клеток (Drisch, Stahl, 2015; Додуева и др., 2016). Поддержанию популяции ствольных клеток в ПЦ способствует фактор транскрипции WUS-RELATED HOMEODOMAIN BOX 5 (WOX5) (Drisch, Stahl, 2015; Ощепкова и др., 2016). Идентичность ПЦ и окружающих его инициалей, а также радиальное структурирование корня зависят от транскрипционных факторов SHORTROOT (SHR) и SCARECROW (SCR), взаимодействующих с белками JACKDAW (JKD) и MAGPIE (MGP) (Wildwater et al., 2005; Ogasawara et al., 2011). Спецификация судьбы эпидермальных корневых клеток связана с транскрипционными факторами WEREWOLF (WER), GLABRA2 (GL2), GLABRA3 (GL3), ENHANCER OF GLABRA3 (EGL3) и CAPRICE (CPC) (Song et al., 2011) и межклеточным сообщением, опосредованным двумя рецепторными киназами (ACR4 и CLV1) и сигнальным пептидом CLAVATA3 (CLV3) (Stahl et al., 2013). Рецепторная киназа SCRAMBLED (SCM) обрабатывает позиционные сигналы дифференцировки эпидермальных клеток в корне (Kwak, Schiefelbein, 2007, 2014).

Покоящийся центр является источником сигналов, поддерживающих свойства ствольных клеток у окружающих его инициалей. Паралогичные киназы *GSO1* и *GSO2* совместно участвуют в позитивной регуляции деления

инициалей колумеллы, а также в контроле дифференцировки их дочерних клеток и идентичности ствольных клеток корня (Racolta et al., 2014). Кроме того, GSO1 и GSO2 контролируют рост корня проростка, модулируя опосредованный сахарозой сигнальный путь, а также интегрируют сигналы, поступающие от надземных органов и ниши ствольных клеток, для правильного структурирования корневого эпидермиса и поддержания активности апикальной меристемы (Racolta et al., 2014). Выключение обеих киназ вызывает усиление митотического деления в ПЦ, что, вероятно, представляет собой компенсирующую стратегию обновления инициалей со сбившейся дифференцировкой и нарушенным пространственно-временным паттерном клеточного деления. Двойная мутация также приводит к дефектной дифференцировке дочерних клеток инициалей колумеллы и пониженному накоплению крахмала в клетках колумеллы (Racolta et al., 2014).

Поскольку гены *GASSHO* охарактеризованы главным образом в *A. thaliana*, их несомненная значимость в сочетании с консервативностью базовых процессов развития придает изучению киназ *GASSHO* в других видах растений особенную актуальность. В настоящей работе мы идентифицировали мРНК двух генов, гомологичных генам *GASSHO*, в микогетеротрофном растении *Monotropa hypopitys*. Были охарактеризованы структура, филогения и паттерн экспрессии генов в различных тканях *M. hypopitys* на стадии цветения.

Материалы и методы

В работе использованы данные секвенирования генома (не опубликовано) и транскриптомов корней с адвентивными почками, прицветников и цветков (Ravin et al., 2016) двух индивидуальных растений подбельника *M. hypopitys*. Растения были собраны на стадии цветения (соцветие состоит из полностью сформированных цветков) в августе 2015 г. в хвойном лесу Калужской области, привезены вместе с дерном и содержались в условиях теплицы при регулируемых параметрах освещенности и влажности в течение недели. Библиотеки мРНК получены на основе суммарной РНК, выделенной с помощью набора RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, США), и секвенированы с использованием платформы Illumina HiSeq2500 (Illumina Inc., США). Всего получено 10–15 млн коротких (размером около 100 нуклеотидов) чтений для каждого транскриптома, которые были собраны в транскрипты с использованием программы Trinity v.2.1.1 (Haas et al., 2013). Идентификацию генов рецепторных киназ, гомологов *GASSHO*, проводили посредством сравнения транскриптов с последовательностями из банка данных NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Генную экспрессию вычисляли как

число транскриптов на миллион транскриптов в транскриптом с нормализацией между образцами с помощью программного обеспечения RSEM (Li, Dewey, 2011). Данные, полученные для каждой пары транскриптомов одного вида, усредняли и вычисляли стандартное отклонение нормализованного числа транскриптов каждого гена от среднего значения с помощью программы Excel. Для структурного анализа последовательностей использовали программы NCBI-CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) и Clone Manager 7.11 (<http://clone-manager-professional.software.informer.com/>). Сравнительный и филогенетический анализы последовательностей генов и кодируемых ими белков проводили с помощью программ NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) и MEGA6 (Tamura et al., 2013) с построением древа методом максимального правдоподобия (maximum likelihood), основанного на модели коррекции Пуассона (Poisson correction) (Zuckerkandl, Pauling, 1965).

Результаты

мРНК двух генов, *MhyGSO1* и *MhyGSO2*, предположительно кодирующих ортологи киназы GSO1 (*A. thaliana*), были идентифицированы в транскриптомах различных тканей (корни с адвентивными репродуктивными почками, прицветники, цветки) подбельника и зарегистрированы в базе NCBI (см. таблицу).

Структурный анализ последовательностей кДНК генов *MhyGASSHO* и кодируемых ими аминокислотных последовательностей показал, что удалось собрать только неполные кДНК (без стоп-кодона). Причиной неполной сборки транскриптов может быть недостаточное качество исходного материала, приготовленных библиотек или секвенирования. Полученные кДНК были транслированы, соответственно, в неполные белковые последовательности *MhyGSO1* (предположительно, отсутствуют 30 С-концевых аминокислот) и *MhyGSO2* (присутствуют первые 250 из возможных 1250 аминокислот). Геномный поиск подтвердил существование идентифицированных транскриптов *MhyGASSHO* и не обнаружил генов, гомологичных *GSO2* (*A. thaliana*). Согласно данным NCBI-CDD, для последовательностей белков *MhyGASSHO* характерны N-терминальный богатый лейцином домен LRRNT и богатые лейцином повторы LRR, а в более полно собранном белке *MhyGSO1* присутствует каталитический домен серин-треониновой киназы (рис. 1). Анализ аминокислотных последовательностей в NCBI-BLAST подтвердил, что гены *MhyGSO1* и *MhyGSO2* кодируют рецепторные киназы LRR-RLK, наиболее идентичные GSO1 из *A. thaliana*. При этом *MhyGSO1* демонстрирует большее сходство с GSO1 и всеми известными его ортоло-

Characteristics of *MhyGASSHO* genes in pinesap

Gene name	Accession number, NCBI	mRNA size, nt	Protein size, aa	<i>A. thaliana</i> homologue	Similarity to the homologue, %
<i>MhyGSO1</i>	KY202763	3669	1223	GSO1	67
<i>MhyGSO2</i>	KY202764	750	250	GSO1	43

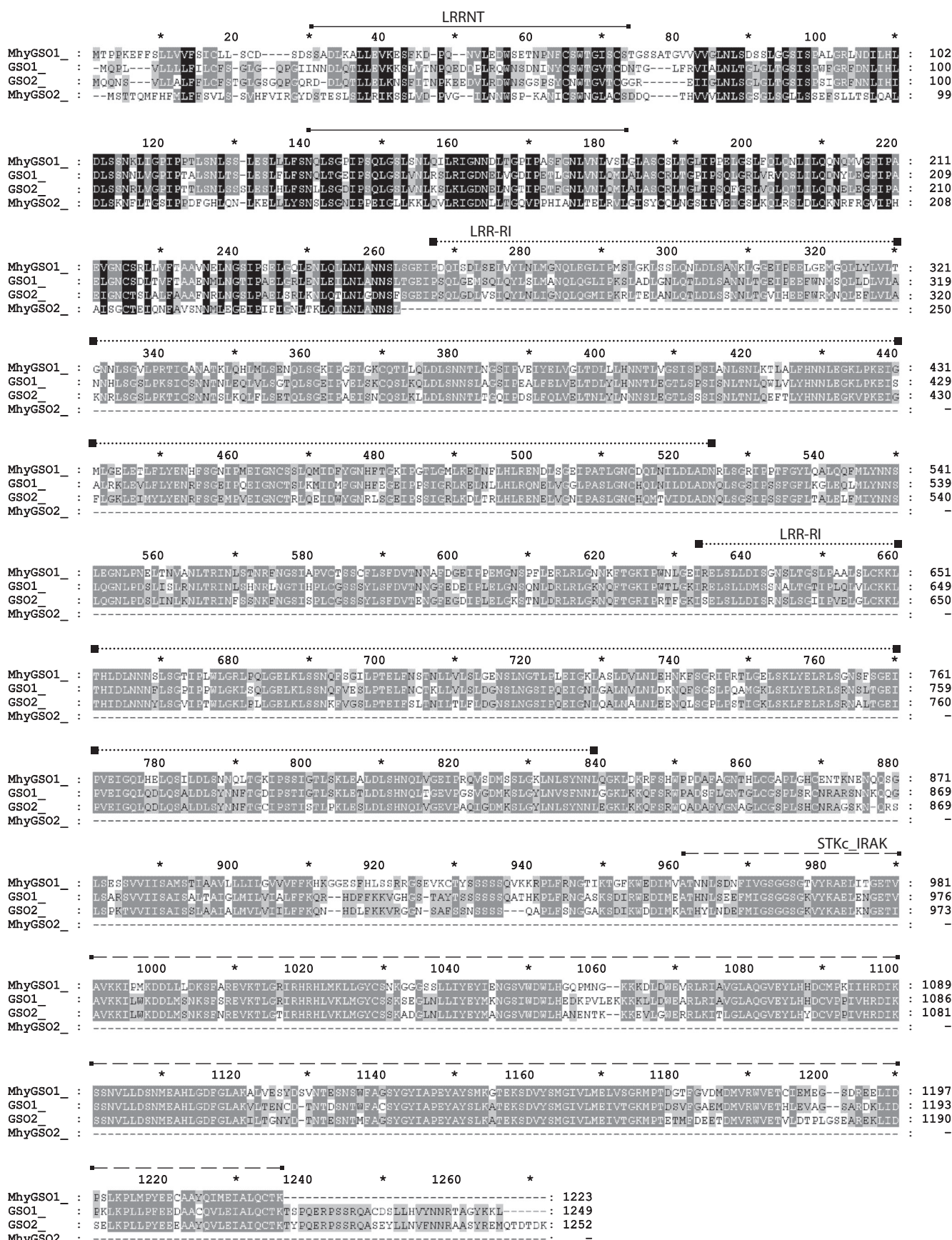


Fig. 1. Comparison of amino acid sequences of MhyGSO1 and MhyGSO2 (pinesap *M. hypopitys*) and known GS01 and GS02 kinases (*A. thaliana*). The solid line indicates the leucine-rich repeat N-terminal domain (LRRNT). The dotted line underlies leucine-rich repeats of the ribonuclease inhibitor-like subfamily (LRR-RI). The dashed line indicates the serine/threonine kinase catalytic domain (STKc) of interleukin-1 receptor associated kinase (IRAK).

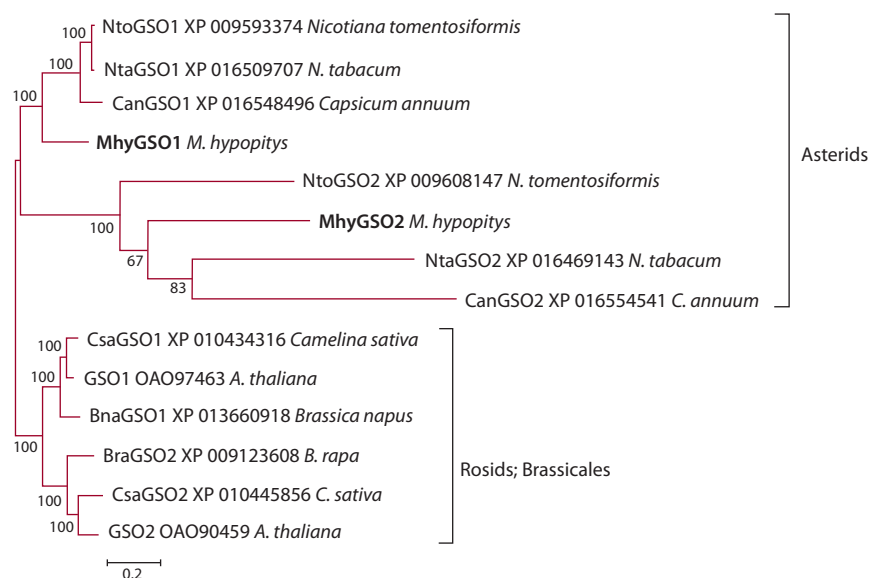


Fig. 2. The unrooted phylogenetic tree constructed on the base of comparative evolutionary analysis of amino acid sequences of MhyGSO1, MhyGSO2, and GASSHO orthologues of Rosids and Asterids species.

The lengths of the branches correspond to the genetic distances (numbers of substitutions per site). Significant bootstrap values (the percentage of trees in which the associated taxa are clustered together) for 1000 replicates are shown at the bases of the branches. The names of proteins available from the NCBI database are followed by GenBank accession numbers.

гами из представителей Rosids и Asterids, в то время как MhyGSO2 наиболее близок белкам-ортологам GSO2 из Asterids.

Структурно-филогенетическое сравнение аминокислотных последовательностей MhyGSO1, MhyGSO2 и ортологов GSO1 и GSO2 у представителей Asterids и Rosids (включая *A. thaliana* и другие Brassicales) показало наиболее тесную кластеризацию белка MhyGSO1 с киназами GSO1 у представителей Asterids и белка MhyGSO2 с киназами GSO2 также у представителей Asterids (рис. 2). Паралоги GSO1 и GSO2 у представителей Brassicales кластеризуются обособленно и вместе составляют сестринскую кладу для группы белков GSO1 и GSO2 у представителей Asterids.

Биоинформатический анализ характера экспрессии выявил наличие мРНК *MhyGSO1* и *MhyGSO2* в цветках и прицветниках. При этом динамика экспрессии этих генов меняется противоположным образом. В корнях с адвентивными почками присутствует только мРНК гена *MhyGSO1* (рис. 3).

Обсуждение

Уникальный представитель цветковых семейства Ericaceae (порядок Ericales в составе базальной группы Asterids), бесхлорофилльный микогетеротроф, подгельник *M. hypopitys* получает питательные вещества от корней автотрофных деревьев через микоризный симбиоз (Leake, 1994). Это растение производит тысячи пылеобразных семян, развитие которых до формирования почек занимает около двух лет (Wallace, 1975; Leake et al., 2004). В течение первого года семена преодолевают морфобиологическое состояние покоя под влиянием сигналов окружающей среды, а во второй год накапливают с помощью микоризы достаточные для роста нефотосинтезирующего растения углеродные ресурсы (Leake et al., 2004). Таким образом, зародыш находится в спящем состоянии до получения внешних и внутренних индуктивных сигналов. Прорастание семян знаменуется проникновением грибов и формированием микоризной корневой системы. Далее на корнях формируются адвентивные почки, содержащие эмбриональное соцветие, из которых в индуктивных условиях развивается надземная часть растения – цветонос с прицветниками и соцветием на конце (Wallace, 1975; Leake et al., 2004).

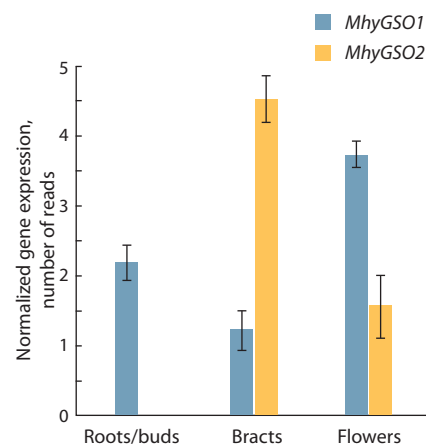


Fig. 3. Tissue-specific expression pattern of *MhyGASSHO* genes in *M. hypopitys* at the late flowering stage.

В норме зародыш семенных растений содержит корешок и почку, из которых развиваются главные корень и побег. Также в зародыше присутствуют гипокотиль и семядоли. Подобно опосредованному микоризой питанию и удалению сигнальных путей фотосинтеза из ядерного и пластидного геномов (Ravin et al., 2016), редуцированная структура зародыша подбельника образовалась, вероятно, как продукт эволюции в процессе приспособления к жизни в практически лишенных света лесных ареалах.

Структурная и генетическая редукция подбельника не коснулась эпидермиса, который является неотъемлемой частью как зародыша, так и растения в целом, благодаря своей защитной функции. Идентификация мРНК генов *MhyGASSHO*, кодирующих рецепторные LRR-RLK киназы MhyGSO1 и MhyGSO2, свидетельствует о наличии консервативного механизма регуляции развития эпидермиса зародыша, корня и, вероятно, надземной части *M. hypopitys*.

Филогенетический анализ генов *MhyGASSHO* предполагает существование общего предшественника генов *GASSHO*, гомологичного *GSO1*, до разделения растений на Rosids и Asterids. В то же время гены, подобные *GSO2*, видимо, появились в результате эволюционных дупликаций, произошедших после разделения Rosids и Asterids. Поэтому с достаточной степенью уверенности можно говорить об ортологии GSO1-киназ у *M. hypopitys* (MhyGSO1) и *A. thaliana*

(GSO1). При этом белок MhyGSO2, паралоги́чный MhyGSO1 и ортологичный представителям клады GSO2 у Asterids, не является ортологом GSO2 (*A. thaliana*). Таким образом, можно предполагать функциональное сходство между MhyGSO1 и GSO1 (*A. thaliana*). Функции же MhyGSO2, вероятно, произошедшего в процессе дупликации общего предшественника генов GSO1 из Asterids и обновившего свой функциональный статус, должны анализироваться отдельно, так как GSO2 охарактеризован только в *A. thaliana*.

Характер экспрессии генов *MhyGSO1* и *MhyGSO2*, различный по динамике и пересекающийся в прицветниках и цветках подъяльника, предполагает взаимодополняющую деятельность в сигнальных путях. В *A. thaliana* экспрессия GSO1 и GSO2 обнаружена в стручочках, семенах и цветках, но не в листьях и стебле; в корнях присутствует в малых количествах мРНК GSO1 (Tsuwamoto et al., 2008). В цветке GSO1 экспрессируется в тычиночной нити и рыльце пестика, а GSO2 – в пыльцевых зернах и разделительном слое между бутонем и цветоножкой; в развивающихся зародышах, семяздолях и гипокотиле гены активны равномерно (Tsuwamoto et al., 2008). В течение шести дней после прорастания паттерны экспрессии GSO1 и GSO2 комплементарны, уровень GSO1 выше уровня GSO2, GSO1 преимущественно присутствует во внутренних слоях корня, ПЦ и апикальной меристеме побега, а GSO2 – во внешних слоях и апикальной меристеме корня, включая ПЦ и инициали корневого чехлика (Racolta et al., 2014). Пространственная экспрессия *MhyGSO1* и *MhyGSO2* во взрослом растении, пусть не столь детализированная, однако соответствует характеру экспрессии GSO1 и GSO2. Подобно GSO1 и GSO2, транскрипты *MhyGSO1* присутствуют в корнях, а *MhyGSO2* – отсутствуют. Кроме того, активность *MhyGSO1* может распространяться на корневые адвентивные почки (эмбриональные соцветия), что также соответствует характеру экспрессии GSO1. Поскольку MhyGSO2 не является ортологом GSO2, активность GSO2 на всех стадиях развития зародыша (Tsuwamoto et al., 2008) может не распространяться на MhyGSO2. Отсутствие мРНК GSO1 и GSO2 в стебле и листьях и наличие мРНК *MhyGSO1* и *MhyGSO2* в предполагаемых прицветниках косвенно подтверждают репродуктивную природу проростка подъяльника. Экспрессия *MhyGSO1* и *MhyGSO2* в цветке, возможно, говорит об их активности в репродуктивных органах, подобной активности GSO1 и GSO2 (Tsuwamoto et al., 2008).

Интегрируя сигналы эндодермы, сосудистой ткани и эпидермиса, киназы GSO1 и GSO2 участвуют в поддержании правильной схемы клеточного деления и спецификации в нише ствольных клеток и эпидермисе (Racolta et al., 2014). Будучи вовлеченными как в зависимую, так и в независимую от сахарозы сигнализацию, GSO1 и GSO2 стимулируют развитие проростка *A. thaliana* в процессе перехода от зародышевого гетеротрофного питания к фотоавтотрофному росту (Racolta et al., 2014). Гетеротрофное питание, характерное и для зародыша, и для взрослого растения *M. hypopitys*, говорит об участии киназ MhyGSO1 и MhyGSO2 в ответе на экзогенную сахарозу, поступающую через микоризу от корней автотрофных деревьев.

Таким образом, в паразитическом высшем растении *M. hypopitys* идентифицированы два паралоги́чных гена *MhyGASSHO*. Структурно-филогенетический анализ показал, что кодируемые генами белки принадлежат семейству рецептор-подобных серин-треониновых киназ с богатыми лейцином повторами. При этом MhyGSO1 и MhyGSO2 являются паралогами, и MhyGSO1 – ортологом киназы GSO1 (*A. thaliana*). Характер экспрессии генов в совокупности с данными эволюционного анализа и литературных источников позволил сделать предположение о возможных функциях генов. Полученные результаты свидетельствуют о консервативности механизмов регуляции развития эпидермиса покрытосеменных с участием генов *GASSHO*.

Acknowledgments

This work was supported by the Russian Science Foundation, project 14-24-00175 “Genome analysis as the base for studying evolutionary adaptation mechanisms”. The authors are grateful to the staff of for granting access to the climatic unit.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Abe M., Katsumata H., Komeda Y., Takahashi T. Regulation of shoot epidermal cell differentiation by a pair of homeodomain proteins in *Arabidopsis*. *Development*. 2003;130(4):635-643. DOI 10.1242/dev.00292.
- Aharoni A., Dixit S., Jetter R., Thoenes E., van Arkel G., Pereira A. The SHINE clade of AP2 domain transcription factors activates wax biosynthesis, alters cuticle properties, and confers drought tolerance when overexpressed in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2004;16(9):2463-2480. DOI 10.1105/tpc.104.022897.
- Aichinger E., Kornet N., Friedrich T., Laux T. Plant stem cell niches. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2012;63:615-636. DOI 10.1146/annurev-arplant-042811-105555.
- Campilho A., Garcia B., Toorn H.V., Wijk H.V., Campilho A., Scheres B. Time-lapse analysis of stem-cell divisions in the *Arabidopsis thaliana* root meristem. *Plant J.* 2006;48(4):619-627. DOI 10.1111/j.1365-3113X.2006.02892.x.
- De Giorgi J., Piskurewicz U., Loubéry S., Utz-Pugin A., Bailly C., Mène-Saffrané L., Lopez-Molina L. An endosperm-associated cuticle is required for *Arabidopsis* seed viability, dormancy and early control of germination. *PLoS Genet.* 2015;11(12):e1005708. DOI 10.1371/journal.pgen.1005708.
- Dodueva I.E., Tvorogova V.E., Azarakhsh M., Lebedeva M.A., Lutova L.A. Plant stem cells: unity and diversity. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2016;20(4):441-458. DOI 10.18699/VJ16.172. (in Russian)
- Driscoll R.C., Stahl Y. Function and regulation of transcription factors involved in root apical meristem and stem cell maintenance. *Front. Plant Sci.* 2015;6:505. DOI 10.3389/fpls.2015.00505.
- Fiume E., Guyon V., Remoué C., Magnani E., Miquel M., Grain D., Lepiniec L. TWS1, a novel small protein, regulates various aspects of seed and plant development. *Plant Physiol.* 2016;172(3):1732-1745. DOI 10.1104/pp.16.00915.
- Haas B.J., Papanicolaou A., Yassour M., Grabherr M., Blood P.D., Bowden J., Couger M.B., Eccles D., Li B., Lieber M., Macmanes M.D., Ott M., Orvis J., Pochet N., Strozzi F., Weeks N., Westerman R., William T., Dewey C.N., Henschel R., Leduc R.D., Friedman N., Regev A. *De novo* transcript sequence reconstruction

- from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nat. Protocols*. 2013;8(8):1494-1512. DOI 10.1038/nprot.2013.084.
- Hooker T.S., Lam P., Zheng H., Kunst L. A core subunit of the RNA-processing/degrading exosome specifically influences cuticular wax biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2007;19(3):904-913. DOI 10.1105/tpc.106.049304.
- Javelle M., Vernoud V., Rogowsky P.M., Ingram G.C. Epidermis: the formation and functions of a fundamental plant tissue. *New Phytol*. 2011;189(1):17-39. DOI 10.1111/j.1469-8137.2010.03514.x.
- Jinn T.L., Stone J.M., Walker J.C. *HAESA*, an *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor kinase, controls floral organ abscission. *Genes Dev*. 2000;14(1):108-117. DOI 10.1101/gad.14.1.108.
- Kwak S.H., Schiefelbein J. The role of the SCRAMBLED receptor-like kinase in patterning the *Arabidopsis* root epidermis. *Dev. Biology*. 2007;302:118-131. DOI 10.1016/j.ydbio.2006.09.009.
- Kwak S.H., Schiefelbein J. TRIPTYCHON, not CAPRICE, participates in feedback regulation of *SCM* expression in the *Arabidopsis* root epidermis. *Plant Signal. Behav.* 2014;9(11):e973815. DOI 10.4161/15592324.2014.973815.
- Leake J.R. The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. *New Phytol*. 1994;127:171-216. DOI 10.1111/j.1469-8137.1994.tb04272.x.
- Leake J.R., McKendrick S.L., Bidartondo M., Read D.J. Symbiotic germination and development of the myco-heterotroph *Monotropa hypopitys* in nature and its requirement for locally distributed *Tricholoma* spp. *New Phytol*. 2004;163(2):405-423. DOI 10.1111/j.1469-8137.2004.01115.x.
- Li B., Dewey C.N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*. 2011;12:323. DOI 10.1186/1471-2105-12-323.
- Mizuno S., Osakabe Y., Maruyama K., Ito T., Osakabe K., Sato T., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. Receptor-like protein kinase 2 (RPK 2) is a novel factor controlling anther development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 2007;50(5):751-766. DOI 10.1111/j.1365-313X.2007.03083.x.
- Moussu S., San-Bento R., Galletti R., Creff A., Farcot E., Ingram G. Embryonic cuticle establishment: the great (apoplastic) divide. *Plant Signal. Behav.* 2013;8(12):e27491. DOI 10.4161/psb.27491.
- Nodine M.D., Tax F.E. Two receptor-like kinases required together for the establishment of *Arabidopsis* cotyledon primordia. *Dev. Biology*. 2008;314(1):161-170. DOI 10.1016/j.ydbio.2007.11.021.
- Ogasawara H., Kaimi R., Colasanti J., Kozaki A. Activity of transcription factor JACKDAW is essential for SHR/SCR-dependent activation of *SCARECROW* and *MAGPIE* and is modulated by reciprocal interactions with *MAGPIE*, *SCARECROW* and *SHORT ROOT*. *Plant Mol. Biol.* 2011;77(4-5):489-499. DOI 10.1007/s11103-011-9826-5.
- Oshchepkova E.A., Omelyanchuk N.A., Savina M.S., Pasternak T., Kolchanov N.A., Zemlyanskaya E.V. Systems biology analysis of the *WOX5* gene and its functions in the root stem cell niche. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2016;20(4):459-474. DOI 10.18699/VJ16.173. (in Russian)
- Racolta A., Bryan A.C., Tax F.E. The receptor-like kinases GSO1 and GSO2 together regulate root growth in *Arabidopsis* through control of cell division and cell fate specification. *Dev. Dynamics*. 2014;243(2):257-278. DOI 10.1002/dvdy.24066.
- Ravin N.V., Gruzdev E.V., Beletsky A.V., Mazur A.M., Prokhortchouk E.B., Filyushin M.A., Kochieva E.Z., Kadnikov V.V., Mardanov A.V., Skryabin K.G. The loss of photosynthetic pathways in the plastid and nuclear genomes of the non-photosynthetic mycoheterotrophic eudicot *Monotropa hypopitys*. *BMC Plant Biol*. 2016;16(Suppl. 3):238. DOI 10.1186/s12870-016-0929-7.
- San-Bento R., Farcot E., Galletti R., Creff A., Ingram G. Epidermal identity is maintained by cell-cell communication via a universally active feedback loop in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 2014;77(1):46-58. DOI 10.1111/tpj.12360.
- Schoof H., Lenhard M., Haecker A., Mayer K.F., Jürgens G., Laux T. The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes. *Cell*. 2000;100(6):635-644. DOI 10.1016/S0092-8674(00)80700-X.
- Shiu S.H., Bleecker A.B. Expansion of the receptor-like kinase/Pelle gene family and receptor-like proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 2003;132(2):530-543. DOI 10.1104/pp.103.021964.
- Song S.K., Ryu K.H., Kang Y.H., Song J.H., Cho Y.H., Yoo S.D., Schiefelbein J., Lee M.M. Cell fate in the *Arabidopsis* root epidermis is determined by competition between WEREWOLF and CAPRICE. *Plant Physiol*. 2011;157(3):1196-1208. DOI 10.1104/pp.111.185785.
- Stahl Y., Grabowski S., Bleckmann A., Kühnemuth R., Weidtkamp-Peters S., Pinto K.G., Kirschner G.K., Schmid J.B., Wink R.H., Hülsewede A., Felekyan S., Seidel C.A., Simon R. Moderation of *Arabidopsis* root stemness by CLAVATA1 and ARABIDOPSIS CRINKLY4 receptor kinase complexes. *Curr. Biol*. 2013;23(5):362-371. DOI 10.1016/j.cub.2013.01.045.
- Takayama S., Sakagami Y. Peptide signalling in plants. *Curr. Opin. Plant Biol*. 2002;5(5):382-387. DOI 10.1016/S1369-5266(02)00284-4.
- 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.
- Torii K.U., Mitsukawa N., Oosumi T., Matsuura Y., Yokoyama R., Whittier R.F., Komeda Y. The *Arabidopsis ERECTA* gene encodes a putative receptor protein kinase with extracellular leucine-rich repeats. *Plant Cell*. 1996;8(4):735-746. DOI 10.1105/tpc.8.4.735.
- Tsuwamoto R., Fukuoka H., Takahata Y. *GASSHO1* and *GASSHO2* encoding a putative leucine-rich repeat transmembrane-type receptor kinase are essential for the normal development of the epidermal surface in *Arabidopsis* embryos. *Plant J*. 2008;54(1):30-42. DOI 10.1111/j.1365-313X.2007.03395.x.
- Wallace G.D. Studies of the Monotropoidae (Ericaceae): taxonomy and distribution. *Wassman J. Biology*. 1975;33:1-88.
- Wildwater M., Campilho A., Perez-Perez J.M., Heidstra R., Blilou I., Korthout H., Chatterjee J., Mariconti L., Gruijssem W., Scheres B. The *RETINOBLASTOMA-RELATED* gene regulates stem cell maintenance in *Arabidopsis* roots. *Cell*. 2005;123(7):1337-1349. DOI 10.1016/j.cell.2005.09.042.
- Yokoyama R., Takahashi T., Kato A., Torii K.U., Komeda Y. The *Arabidopsis ERECTA* gene is expressed in the shoot apical meristem and organ primordia. *Plant J*. 1998;15(3):301-310. DOI 10.1046/j.1365-313X.1998.00203.x.
- Zuckerandl E., Pauling L. Evolutionary Divergence and Convergence in Proteins: Symp. held at the Inst. of Microbiology of Rutgers. N. Y.: Acad. Press, 1965;97-166.



Создание нового для мягкой пшеницы генотипа – носителя двух локусов мягкозерности эндосперма

А.В. Симонов¹✉, А.К. Чистякова¹, Е.В. Морозова¹, Л.В. Щукина¹, А. Бёрнер², Т.А. Пшеничникова¹

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

² Институт им. Лейбница генетики растений и исследования возделываемых культур, Гатерслебен, Германия

Технологическое назначение зерна и муки мягкой пшеницы определяется в значительной степени структурой эндосперма зерновок. Ее изменчивость у сортов мягкой пшеницы зависит в основном от множественного аллелизма по одному локусу, *Ha*, в хромосоме 5D, приводящего к непрерывной вариации этого признака. Эндосперм зерна может изменяться от твердозерного стекловидного, пригодного для дрожжевого хлебопечения, до мягкозерного мучнистого, благоприятного для кондитерских и технических целей. Кроме того, на данные признаки, особенно на стекловидность, сильное влияние оказывают условия выращивания. Ранее в хромосому 5A линии 84/98^w был интрогрессирован локус *Ha-Sp* от *Aegilops speltoides* Tausch., который снижает твердозерность и стекловидность эндосперма, подобно доминантному аллелю локуса *Ha*. В данной работе впервые описаны получение и испытание супермягкозерных линий, в генотипе которых объединены гомеоаллельные локусы *Ha-Sp* линии 84/98^w и *Ha* мягкозерного сорта Chinese Spring. Линии выделены из шестого-восьмого поколений самоопыленных гибридов F₂. Они стабильно в полевых и тепличных условиях демонстрируют большую, чем родительские формы, мягкозерность. Эти линии могут быть использованы в селекции сортов пшеницы, для муки из которых не потребуются химические разрыхлители в кондитерском производстве. Возможно также их применение в технических целях для производства биоэтанола. Кроме того, эти линии могут послужить генетической моделью для изучения функциональной активности гомеоаллельных генов в сложных полиплоидных геномах растений.

Ключевые слова: мягкая пшеница; структура эндосперма зерновки; локусы *Ha* и *Ha-Sp*; супермягкозерные линии пшеницы.

The development of a new bread wheat genotype carrying two loci for endosperm softness

A.V. Simonov¹✉, A.K. Chistyakova¹, E.V. Morozova¹, L.V. Shchukina¹, A. Börner², T.A. Pshenichnikova¹

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

² Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Gatersleben, Germany

The technological purpose of grain and flour wheat is largely determined by the grains endosperm structure. Its variability among wheat varieties depends mainly on the multiple allelism for a single *Ha* locus on chromosome 5D leading to a continuous variation of the trait. The grain endosperm can vary from hard and vitreous suitable for yeast baking to soft and floury favorable for confectionery and technical purposes. Furthermore, these traits, especially vitreousness, are strongly influenced by the growth conditions. Earlier, the *Ha-Sp* locus was introgressed into chromosome 5A of the bread wheat line 84/98^w from *Aegilops speltoides* Tausch., which reduces endosperm hardness and vitreousness, like the dominant allele of the *Ha* locus. This paper is the first to describe the obtaining and testing of the supersoft lines combining in their genotype the homoeoallelic loci *Ha-Sp* of the line 84/98^w and *Ha* of the soft grain cultivar Chinese Spring. The lines were isolated from 6–8 generations of self-pollinated F₂ hybrids. They consistently exhibit a greater grain softness than the parental forms under both greenhouse and field conditions. These lines can be used in the breeding of wheat cultivars, the flour of which will not require chemical baking powder in the confectionery industry. It is also possible to use them for technical purposes for the production of bioethanol. In addition, these lines may serve as a genetic model for the study of the functional activity of homoeoallelic genes in the complex polyploid genomes of plants.

Key words: bread wheat; grain endosperm structure; *Ha* and *Ha-Sp* loci; supersoft wheat lines.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Симонов А.В., Чистякова А.К., Морозова Е.В., Щукина Л.В., Бёрнер А., Пшеничникова Т.А. Создание нового для мягкой пшеницы генотипа – носителя двух локусов мягкозерности эндосперма. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(3):341-346. DOI 10.18699/VJ17.251

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Simonov A.V., Chistyakova A.K., Morozova E.V., Shchukina L.V., Börner A., Pshenichnikova T.A. The development of a new bread wheat genotype carrying two loci for endosperm softness. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(3):341-346. DOI 10.18699/VJ17.251

Технологическое назначение зерна пшеницы определяется мукомольными параметрами, зависящими от структуры эндосперма зерновки. Основная изменчивость структуры эндосперма у мягкой пшеницы – стекловидность/мучнистость и твердозерность/мягкозерность – зависит от аллелей генов *Pina* и *Pinb*, сцепленных в локусе *Ha* в хромосоме 5D (Symes, 1969; Morris, 2002). Синтез с доминантных аллелей этих генов белков пуроиндолинов приводит к формированию мягкого мучнистого эндосперма. Таким образом, мука из размолотого зерна состоит из относительно мелких частиц крахмала в белковой оболочке, не доступных дрожжам (Козьмина, 1955). Мутации генов в локусе *Ha* приводят к нарушению синтеза пуроиндолинов, вследствие чего крахмальные зерна слипаются в монолитную стеклообразную структуру. При размоле стекловидного зерна мука состоит из относительно крупных осколков незащищенного крахмала, доступного для дрожжей.

У тетраплоидного предка в хромосомах 5A и 5B произошли делеции генов *Pina* и *Pinb* в гомеоаллельных локусах, что вызывает высокую твердозерность у вида твердой пшеницы (Gautier et al., 2000). Селекционный процесс привел к появлению у мягкой пшеницы множества рецессивных аллелей генов *Pina* и *Pinb*, в том числе нуль-аллелей, синтез белка с которых в разной степени нарушен. Среди сортов можно наблюдать непрерывную вариацию этих признаков – от мягкого мучнистого до твердого стекловидного эндосперма, так же, как у твердой пшеницы. Таким образом, изменчивость структуры эндосперма сортов мягкой пшеницы в основном зависит от аллелей одного локуса *Ha* на хромосоме 5D. Кроме того, на данные признаки, особенно на стекловидность, сильное влияние оказывают условия выращивания.

Ранее нами был обнаружен новый локус *Ha-Sp* мягкозерности в хромосоме 5A, интрогрессированный в линию 84/98^w от *Ae. speltoides* Tausch. (Pshenichnikova et al., 2010). Линия получена на основе твердозерного сорта Родина, носителя рецессивного аллеля локуса *Ha* в хромосоме 5D. Интрогрессированный локус *Ha-Sp*, подобно доминантному локусу *Ha*, приводит к формированию зерен с мягким полустекловидным эндоспермом. Поскольку локусы *Ha-Sp* и *Ha* гомеоаллельны, их можно объединить в одном генотипе и изучить совместное действие на структуру зерновки.

Для производства разных мучных изделий требуются зерно и мука с разными технологическими свойствами (Реña, 2002). В производстве качественного дрожжевого хлеба важны высокая твердозерность и стекловидность. Крекеры или белая лапша готовятся из зерна средней твердости и стекловидности. Для кондитерских целей, напротив, имеют значение мягкозерность и мучнистость зерна пшеницы. Обогащение генетического разнообразия пшеницы за счет еще одного гена мягкозерности эндосперма расширяет спектр возможностей целенаправленного технологического использования зерна и муки.

Целью работы стало создание гомозиготных линий с объединенными в одном генотипе локусами мягкозерности *Ha* и *Ha-Sp* и их оценка в различных условиях среды. Для этого была проведена гибридизация мягкозерного сорта Chinese Spring и линии 84/98^w, и в течение ряда

самоопыленных поколений продолжался отбор, сопровождавшийся технологическим анализом. К настоящему времени из шестого-восьмого поколений выделен ряд линий с более мягким относительно родительских форм мучнистым эндоспермом зерновки.

Материалы и методы

Генетический материал. В качестве исходных родительских генотипов использованы интрогрессивная озимая линия 84/98^w из коллекции «Арсенал» (Lapochkina, Yatchevskaya, 1997) и сорт Chinese Spring. Они имеют мягкое зерно со стекловидностью в разных условиях около 50 % и диаметром частиц муки (ДЧМ) от 11 до 15 мкм. Сорт Chinese Spring несет доминантный аллель локуса *Ha* хромосомы 5D, обеспечивающий мягкозерность. Линия 84/98^w унаследовала от реципиентного твердозерного сорта Родина рецессивный аллель локуса *Ha*. Она несет интрогрессированный от *Ae. speltoides* локус мягкозерности *Ha-Sp* в коротком плече хромосомы 5A (Pshenichnikova et al., 2010). О наличии интрогрессии в дистальной области короткого плеча также свидетельствует присутствие субтеломерного повтора *Spelt52* (Salina et al., 2001). Для анализирующего скрещивания использовали твердозерную линию 170/98ⁱ из коллекции «Арсенал», носителя рецессивных аллелей.

Условия проведения эксперимента. Выращивание материала проводили в осенний и весенний периоды вегетации (с октября по январь и с февраля по май соответственно) в условиях гидропонной теплицы ИЦиГ СО РАН с искусственной подсветкой. В качестве субстрата использовали керамзит, а для питания – раствор Кнопа. Гибриды разных поколений высевали семьями по 10 шт. Кроме того, некоторые семьи поздних поколений по 20–100 шт. выращивали на полях ИЦиГ СО РАН (г. Новосибирск). Размножение гибридов F₂ проводили в 2010 г. в земляных теплицах института ИРК (Гатерслебен, Германия).

Методика определения технологических свойств. Мукомольные показатели изучали в соответствии с методиками, принятыми в России для сортоиспытания сортов сельскохозяйственных культур (Методика..., 1988).

Стекловидность зерна оценивали по характеру поперечного среза у каждого растения по отдельности. При этом для достижения максимально возможной точности индивидуальной оценки использовали все зерна, которые давало растение, но не более 100. Этот подход позволяет сделать вывод о гомо- или гетерогенности семей, а также наблюдать динамику изменения признака в поколениях.

Для последующего анализа на твердозерность зерна отдельных гибридных растений ранжировали по стекловидности. Твердозерность определяли на приборе ПСХ-4, для которого требуются пробы зерна по 6 г. Эти пробы состояли из смеси зерен с нескольких растений, разделенных в группы по принципу родства и схожей стекловидности. О твердозерности судят по диаметру частиц муки, полученной при размоле пробы зерна. Чем больше ДЧМ, тем больше твердость зерновок.

Определение упругости (P), растяжимости (L) и силы муки (W) проводили на альвеографе у отобранных гомозиготных семей F₆–F₈ из 50–100 г муки (одна-две повторности соответственно).

Для наглядного графического отображения распределения семей по твердозерности и стекловидности, а также статистических оценок использовали программы MS Excel и Past.

Результаты

Как было установлено ранее моносомным анализом, интрогрессивная линия 84/98^w несет гомеологичный ген *Ha-Sp* от *Ae. speltoides* Tausch. в хромосоме 5A (Pshenichnikova et al., 2010). Поэтому линия имеет мягкое полустекловидное зерно, его стекловидность в разных условиях выращивания составляет 50–70 %, а ДЧМ 11–15 мкм. Реципиентный сорт Родина – твердозерный, имеет стекловидность 85–90 %, ДЧМ более 23 мкм. Типичный образец мягкой пшеницы с активным локусом мягкозерности *Ha* хромосомы 5D – сорт Chinese Spring. Стекловидность его зерновок в различных условиях порядка 50–75 %, а ДЧМ – 11–15 мкм.

На рис. 1 представлены характеристики эндосперма групп растений двух популяций F₂ Chinese Spring × 84/98^w и F₂ 170/98ⁱ × 84/98^w. Первая популяция – потомство от двух мягкозерных генотипов, а вторая – потомство от твердозерной и мягкозерной линий. У гибридов F₂ Chinese Spring × 84/98^w наблюдалась значительная трансгрессия по стекловидности эндосперма. Изменчивость выходила за рамки значений родительских генотипов, ее пределы составили 26.8–92.4 %. Изменчивость второй популяции по стекловидности сосредоточена практически в пределах от 50.1 до 96.9 %.

Стекловидность тесно коррелирует с твердозерностью, что было отмечено на различных образцах мягкой пшеницы. При этом твердозерность меньше зависит и от условий среды (Дундук, Ермакова, 1978). Поэтому в F₂ также был проведен анализ твердозерности с целью выяснить, насколько тесной окажется их корреляция при взаимодействии двух генов. Зерно, объединенное с растений со схожей стекловидностью в группы до навесок по 6 г, было размолото для определения ДЧМ – показателя твердозерности. На рис. 2 показано распределение этих групп растений по ДЧМ и стекловидности. Лимиты изменчивости составили для ДЧМ от 10.17 до 20.23 мкм, а для стекловидности – от 27 до 92 %. Коэффициент корреляции $r = 0.83$. Однако в пределах рангов со схожими значениями ДЧМ наблюдали существенные различия по стекловидности (см. рис. 2). Например, для зерна с ДЧМ 14–15 мкм разброс значений стекловидности был от 45 до 85 %, а для зерна с ДЧМ 12–13 мкм он составляет от 33 до 65 %. Таким образом, среди популяций F₂ Chinese Spring × 84/98^w становится возможным вести отбор растений на меньшие стекловидность и твердозерность, чем у родителей.

Дальнейший отбор в последовательных поколениях сопровождался трудностями, связанными с постоянным расщеплением в семьях от наиболее мягкозерных растений – носителей доминантных аллелей локусов *Ha* и *Ha-Sp*. На рис. 3 приведены данные по структуре эндосперма трех типов семей F₅ в сравнении с родителями. Выщипавшиеся твердозерные растения (на рисунке обозначены «+») с высокими стекловидностью и ДЧМ стабильно передавали эти признаки в ряду поколений и более не расщеплялись,

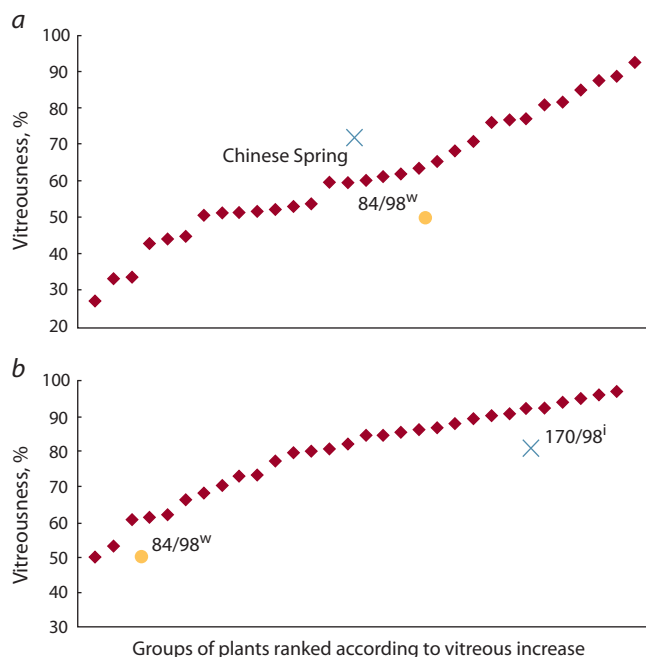


Fig. 1. Ranking of groups of plants from two populations: (a) F₂ Chinese Spring × 84/98^w and (b) F₂ 170/98ⁱ × 84/98^w.

Each dot indicates a group of plants similar in vitreousness.

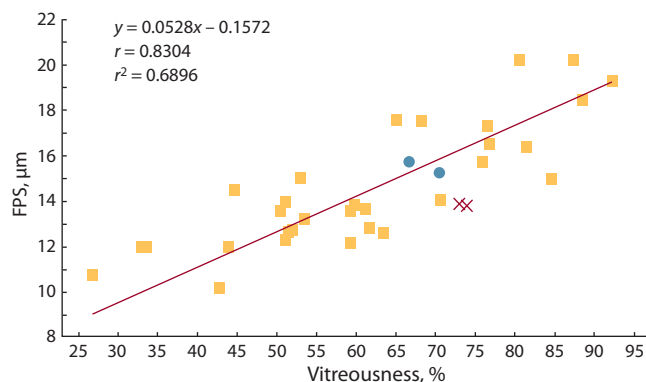


Fig. 2. Distribution of plant groups from F₂ Chinese Spring × 84/98^w according to vitreousness and FPS.

○ – line 84/98^w; × – Chinese Spring; □ – F₂ CS × 84/98^w.

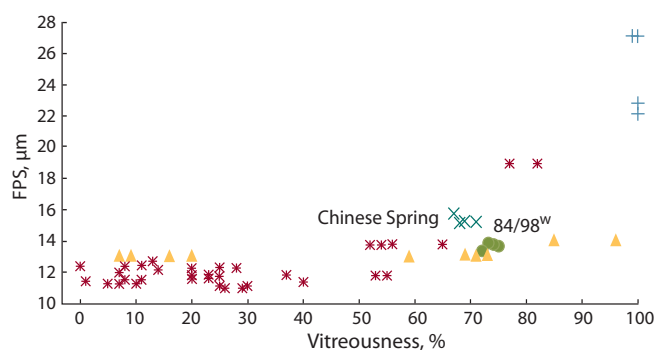


Fig. 3. Relative variation of vitreousness and grain hardness inside families F₅ Chinese Spring × 84/98^w.

○ – line 84/98^w; × – Chinese Spring; *, +, Δ – families F₅ CS × 84/98^w.

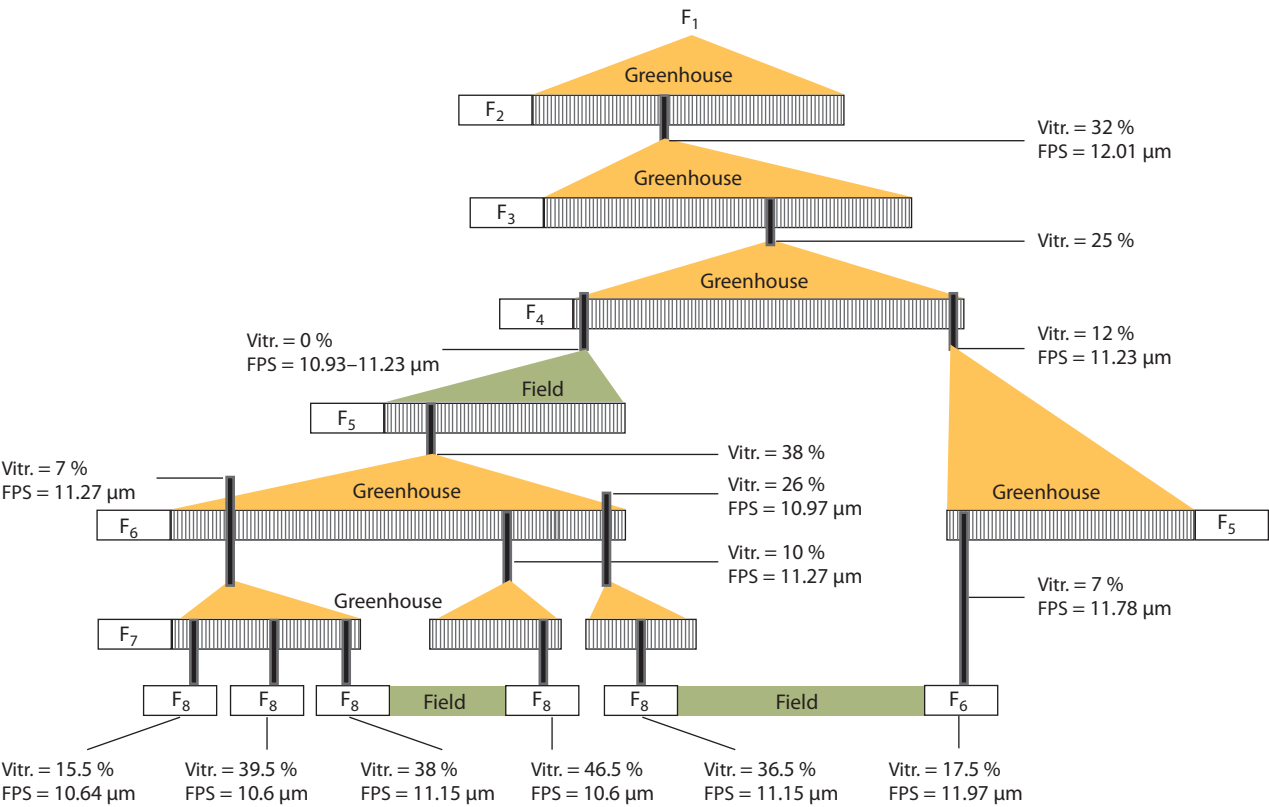


Fig. 4. Family tree of ultrasoft-grain common wheat lines.
Vitr., vitreousness; FPS, flour particle size.

Grain hardness and alveographic indices in selected ultrasoft-grain families (field-grown)

Technological indices	Line 84/98 ^{w*}	Chinese Spring	F ₈	F ₈	F ₈	F ₆
Vitreousness, %	50.5	50	15.5	43	37.3	17.5
Flour particle size, μm	14.5	14.7	11.5	10.6	11.2	12.00
Deformation energy, W	–	52.1	67.0	68.3	76.6	42.2
Dough stiffness, P	–	52.8	50.6	56.7	62.4	34.7
Dough extensibility, L	–	33	55	35	36.5	36
Stiffness : extensibility rati	–	1.6	0.92	1.62	1.71	0.96

* Greenhouse-grown.

будучи гомозиготными носителями рецессивных аллелей. Далее эти растения не отбирали. Вторая группа растений с ДЧМ около 13 мкм на уровне 84/98^w линии обнаруживала большую изменчивость по стекловидности – от 25 до 96 % (обозначены «Δ»). Третья группа (обозначена «*») тоже имела высокую изменчивость по стекловидности, от 0 до 83 %, а значения ДЧМ колебались в пределах 11–19 мкм. Скорее всего, эти семьи произошли от гетеро- и дигетерозигот по генам *Ha* и *Ha-Sp* соответственно. Из второй и третьей групп отбирали семьи с наименьшими показателями стекловидности и твердозерности (рис. 4), в которых вероятность выделения гомозигот была больше.

Потомки наиболее мягкозерных растений в значительной части оказывались озимыми. О затрудненной реком-

бинации интрогрессированной хромосомы с хромосомой 5A пшеницы у гибридов с линией 84/98^w сообщалось в предыдущих работах (Симонов и др., 2009; Pshenichnikova et al., 2010; Симонов, Пшеничникова, 2012). Это сужало поле для отбора. На рис. 4 приведена полная схема отбора супермягкозерных растений, которая показывает, что весь отбор берет начало от одного из 200 первоначально выращенных растений F₂.

К настоящему времени из потомства поздних поколений гибридов мучнистых образцов Chinese Spring × 84/98^w выделены линии с очень мягкозерным мучнистым эндоспермом зерновки, стекловидностью менее 50 % и ДЧМ 10–12 мкм (см. рис. 4). Эти свойства сохранялись у линий в полевых и тепличных условиях. Проведены испытания физических свойств теста у линий F₆–F₈ на альвеографе.

Эти линии имеют очень низкую силу муки: от 42 до 76 ед. альвеографа (таблица). Для кондитерских изделий (песочное печенье, пряники, бисквиты) предпочтительно использование именно такой муки, без применения химических разрыхлителей (Рефа, 2002).

Обсуждение

В настоящее время locus *Ha-Sp* – единственный изученный пример интрогрессии гена мягкозерности эндосперма в мягкую пшеницу от дикого сородича. В нашей работе впервые объединены в одном генотипе два гомеоаллельных гена, определяющих характеристики эндосперма зерновки, и изучен их совместный эффект на мукомольные показатели – стекловидность и ДЧМ. По отдельности гены вызывают формирование зерен с мягким полустекловидным эндоспермом и достаточно низким диаметром частиц муки. Несмотря на то, что доминантный аллель локуса *Ha* обеспечивает мягкозерность, вариабельность по стекловидности может ухудшать технологические свойства муки для кондитерских изделий. Это вызывает необходимость применения химических добавок для достижения высокого потребительского качества кондитерских изделий. Ожидалось, что гибриды линии 84/98^w с мягкозерным образцом пшеницы могут дать более мучнистое и мягкое зерно вследствие взаимодействия двух локусов, *Ha-Sp* и *Ha*. Действительно, если изменчивость стекловидности при моногибридном скрещивании с участием гена локуса *Ha-Sp* находилась в пределах родительских форм, то при дигибридном скрещивании диапазон изменчивости был очень широким. Вследствие взаимодействия двух локусов, *Ha-Sp* и *Ha*, выделены семьи растений со стекловидностью зерна менее 50 %, более мучнистого, чем у родителей. В дальнейшем отбирали только семьи с самой низкой стекловидностью. К шестому-восьмому поколению были выделены линии с узкой вариабельностью как по стекловидности, так и по диаметру частиц муки, существенно отличающиеся от родителей по данным показателям (рис. 5). Это подтверждает присутствие обоих исходных локусов мягкозерности в генотипе линий, которые действуют на проявление признака аддитивно. Как показал технологический анализ зерна линий тепличной и полевой вегетаций, оно стабильно сохраняет эти свойства.

Таким образом, нами получены линии с новыми для мягкой пшеницы свойствами зерна и муки. Муку таких генотипов можно использовать как непосредственно для производства кондитерских изделий, так и в качестве улучшителя кондитерских свойств муки хлебопекарного назначения. Это позволит избежать адаптации сырья в производственном процессе путем внесения различных химических добавок, в частности химических разрыхлителей. В некоторых странах, например в Канаде, зерно с такими показателями представляет отдельный товарный класс (Canadian Grain Commission..., 2015).

Примером использования генетических манипуляций для создания новой злаковой культуры с расширенным кругом конечного технологического назначения зерна и муки служит получение мягкой разновидности пшеницы *T. durum* (Morris, Fuerst, 2013) путем введения локуса мягкозерности эндосперма *Ha* из хромосомы 5D мягкой пшеницы. Это позволяет теперь использовать твердую

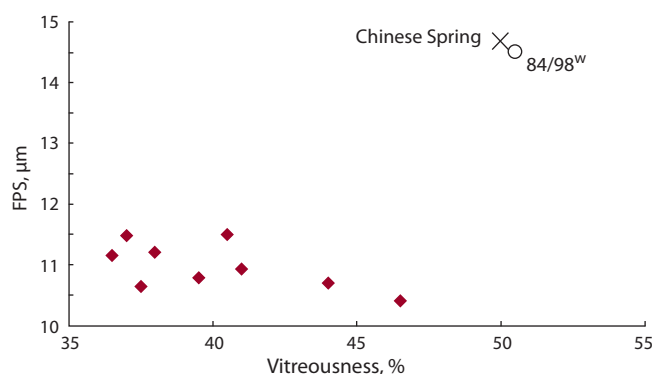


Рис. 5. Change of vitreousness and grain hardness in F₈ Chinese Spring × 84/98^w in comparison to the ancestor.

O – line 84/98^w; X – Chinese Spring; ◆ – plants F₈ CS × 84/98^w.

пшеницу для производства не только макаронных изделий, но и различных видов хлеба.

Значительная вариабельность по структуре эндосперма зерновки мягкой пшеницы, которая обнаруживается только у этого вида злаковых, имеет большое значение в различных кулинарных и технических целях. Полученные линии, возможно, могут служить техническим сырьем для производства биоэтанола. В Великобритании, например, для этих целей существует специальное селекционное направление. Оно нацелено на создание современных высокоурожайных сортов пшеницы для дистилляции спиртных напитков и получения биоэтанола (Kindred et al., 2008; David et al., 2015).

Созданный нами генетический материал может быть использован и в фундаментальных исследованиях в качестве модели в экспериментах по изучению функциональной активности гомеоаллельных генов в сложных полиплоидных геномах растений.

Acknowledgments

This work was supported by State Budgeted Project 0324-2016-0001.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Canadian Grain Commission. Official Grain Grading Guide, Wheat, 2015. Available at <http://www.grainscanada.gc.ca/index-eng.htm>.
- David I.G., Green D.I.G., Agu R.C., Bringham T.A., Brosnan J.M., Jack F.R., Walker G.M. Maximizing alcohol yields from wheat and maize and their co-products for distilling or bioethanol production. J. Inst. Brew. 2015;121:332-337. DOI 10.1002/jib.236.
- Dunduk I.G., Ermakova M.F. The hardness trait as an indicator of wheat quality. Sibirskii vestnik sel'skokhozyastvennoi nauki = Siberian Herald of Agricultural Science. 1978;1:15-19. (in Russian)
- Gautier M.-F., Cosson P., Guirao A., Alary R., Joudrier P. Puroindoline genes are highly conserved in diploid ancestor wheats and related species but absent in tetraploid *Triticum* species. Plant Sci. 2000; 153:81-91.
- Kindred D.R., Verhoeven T.M.O., Weightman R.M., Swanston J.S., Agu R.C., Brosnan J.M., Sylvester-Bradley R. Effects of variety and fertiliser nitrogen on alcohol yield, grain yield, starch and pro-

- tein content, and protein composition of winter wheat. *J. Cereal Sci.* 2008;48:46-57. DOI 10.1016/j.jcs.2007.07.010.
- Kozmina N.P. *Zernovedenie* [Grain science]. Moscow: Zagotizdat Publ., 1955. (in Russian)
- Lapochkina I.F., Yatchevskaya G.L. Pollen irradiation method in distant wheat hybridization. *Ann. Wheat Newslett.* 1997;43:193-195.
- Metodika Gosudarstvennogo sortoispytaniya sel'skokhozyaystvennykh kul'tur [Methods of state variety testing of crops]. Moscow: Gosagroprom Publ., 1988. (in Russian)
- Morris C.F. Puroindolines: the molecular genetic basis of wheat grain hardness. *Plant Mol. Biol.* 2002;48:633-647.
- Morris C.F., Fuerst E.P. Quality characteristics of soft kernel durum; a new cereal crop. *Advances in Wheat Genetics: From Genome to Field*. Eds. Y. Ogihara, S. Takumi, H. Handa. Tokyo: Springer, 2013;275-278.
- Peña R.L. Wheat for bread and other foods. *Bread Wheat*. Eds. B.C. Curtis, S. Rajaram, H. Gómez Macpherson. Improvement and Production FAO. 2002. <http://www.fao.org/docrep/006/Y4011e/y4011e0w.htm#bm32>.
- Pshenichnikova T.A., Simonov A.V., Ermakova M.F., Chistyakova A.K., Shchukina L.V., Morozova E.V. The effects on grain endosperm structure of an introgression from *Aegilops speltoides* Tausch. into chromosome 5A of bread wheat. *Euphytica*. 2010;175(3):315-322.
- Salina E.A., Adonina I.G., Efremova T.T., Lapochkina I.F., Pshenichnikova T.A. The genome-specific subtelomeric repeats for study of introgressive lines *T. aestivum* × *Ae. speltoides*. *EWAC Newslett.* 2001;161-164.
- Simonov A.V., Pshenichnikova T.A. Chromosomal localization of the speltoidy gene, introgressed into bread wheat from *Aegilops speltoides* Tausch., and its interaction with the *Q* gene of *Triticum spelta* L. *Russ. J. Genetics (Moscow)*. 2012;48(11):1120-1127. DOI 10.1134/S1022795412110117.
- Simonov A.V., Pshenichnikova T.A., Lapochkina I.F. Genetic analysis of the traits introgressed from *Aegilops speltoides* Tausch. to bread wheat and determined by chromosome 5A genes. *Russ. J. Genetics (Moscow)*. 2009;45(7):799-804. DOI 10.1134/S1022795409070060.
- Symes K.J. Influence of a gene causing hardness on the milling and baking quality of two wheats. *Aust. J. Agric. Res.* 1969;20(6): 971-979.



Оценка линий синтетической пшеницы (*Triticum durum/Aegilops tauschii*) по вегетационному периоду и устойчивости к болезням

В.П. Шаманин¹✉, И.В. Потоцкая¹, С.С. Шепелев¹, В.Е. Пожерукова¹, А.Ю. Трущенко¹, А.С. Чурсин¹, А.И. Моргунов²

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина», Омск, Россия

² Представительство Международного центра по улучшению кукурузы и пшеницы (CIMMYT), Анкара, Турция

К приоритетным направлениям развития растениеводства в России относятся рост валового производства зерна пшеницы и повышение стабильности урожая по годам. Урожайность зерна коммерческих сортов значительно варьирует из-за громадных потерь от воздействия неблагоприятных биотических и абиотических факторов. Повышение устойчивости к стрессовым факторам создаваемых сортов мягкой пшеницы может быть достигнуто за счет привлечения в гибридизацию всего разнообразия генетических ресурсов близкородственных видов и родов. Представлены результаты фенотипической оценки линий гексаплоидной синтетической пшеницы, созданных в CIMMYT скрещиванием сортов твердой пшеницы селекции Селекционно-генетического института (г. Одесса, Украина) и сорта Pandur из Румынии (*T. durum* Desf., геном AB) с *Ae. tauschii* Coss. (геном D), а также 15 линий синтетической пшеницы селекции Киотского университета (Япония), полученных скрещиванием сорта твердой пшеницы Langdon (США) с формами эгилоса различного экологического происхождения. Исследования проведены в 2016 г. на опытном поле Омского государственного аграрного университета в условиях южной лесостепи Западной Сибири. Между синтетиками выявлены генотипические различия по продолжительности периода «всходы–колошение» и по устойчивости к болезням. Наиболее скороспелые линии отмечены в гибридной комбинации Aisberg/*Ae.sq.*(511). Гибридные комбинации *Ae.sq.*(369) с сортом твердой пшеницы Aisberg, *Ae.sq.*(310) с сортом Ukr-Od 1530 и *Ae.sq.*(223) с сортом Pandur характеризуются комплексной устойчивостью к грибным болезням. В целом варьирование степени поражения линий ржавчиной было в пределах от 5 до 70 %, мучнистой росой – от 10 до 90 %. Выделены линии с высокой комплексной устойчивостью к мучнистой росе, бурой и стеблевой ржавчине, полученные скрещиванием сорта Ukr-od 1530.94 с *Ae. tauschii* (392); (629); (1027); (1031) и линий Langdon/Ku-2074; Langdon/Ku-2075; Langdon/Ku-2100; Langdon/Ku-2079. Выделенные по комплексу ценных признаков линии синтетиков пшеницы представляют интерес в качестве исходного материала для селекционных программ.

Ключевые слова: синтетическая пшеница; фенотипирование; вегетационный период; бурая и стеблевая ржавчина; мучнистая роса; устойчивость.

Evaluation of synthetic wheat lines (*Triticum durum/Aegilops tauschii*) for vegetative period and resistance to diseases

V.P. Shamanin¹✉, I.V. Pototskaya¹, S.S. Shepelev¹, V.E. Pozherukova¹, A.Yu. Trushchenko¹, A.S. Chursin¹, A.I. Morgunov²

¹ Omsk State Agrarian University named after P.A. Stolypin, Omsk, Russia

² CIMMYT-Turkey, Ankara, Turkey

The growth of the total wheat production and increase of yield stability from year to year are some of the priorities of agriculture in Russia. The yield of commercial varieties significantly diversifies due to huge losses of their potential under the influence of negative biotic and abiotic factors. Increase of resistance to stress factors in the emerging varieties can be achieved by utilizing the diversity of the genetic resources of related wild species and genera in crosses. The results of a phenotypic evaluation of the synthetic hexaploid wheat lines of CIMMYT breeding created by crossing durum wheat varieties from Institute of Breeding and Genetics (Odessa, Ukraine) and variety Pandur from Romania (*T. durum* Desf., AB genome) with *Aegilops* (*Ae. tauschii* Coss., D genome), and also 15 synthetic wheat lines of Kyoto University breeding (Japan) created by crossing durum wheat variety Langdon with different ecological forms *Aegilops* are presented. Research was performed on the experimental field of Omsk SAU under conditions of southern forest-steppe of West Siberia in 2016. Between synthetics, there was revealed a genotypic difference in the vegetative period duration and resistance to diseases. Lines of hybrid combination Aisberg/*Ae.sq.*(511) were characterized as the most early-maturity genotypes among the lines studied. The hybrid combinations *Ae.sq.*(369) with variety Aisberg, *Ae.sq.*(310) and Ukr-Od 1530, *Ae.sq.*(223) and Pandur are characterized by complex resistance to fungal diseases. Most of the lines demonstrated high and moderate resistance to rust fungus, severity ranging from 5 to 70 % and severity of powdery mildew being 10–90 %. Lines derived from variety Ukr-Od 1530.94 and accessions *Ae. tauschii* (392); (629); (1027); (1031) and lines Langdon/Ku-2074; Langdon/Ku-2075; Langdon/Ku-2100; Langdon/Ku-2079 are characterized by complex resistance to powdery mildew, leaf

and stem rust. The synthetic lines with a complex of economically valuable traits present interest as an initial material for breeding programs.

Key words: synthetic wheat; phenotyping; vegetative period; leaf and stem rust; powdery mildew; resistance.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Шаманин В.П., Потоцкая И.В., Шепелев С.С., Пожерукова В.Е., Трущенко А.Ю., Чурсин А.С., Моргунов А.И. Оценка линий синтетической пшеницы (*Triticum durum/Aegilops tauschii*) по вегетационному периоду и устойчивости к болезням. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(3):347-353. DOI 10.18699/VJ17.252

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Shamanin V.P., Pototskaya I.V., Shepelev S.S., Pozherukova V.E., Truschenko A.Yu., Chursin A.S., Morgunov A.I. Evaluation of synthetic wheat lines (*Triticum durum/Aegilops tauschii*) for vegetative period and resistance to diseases. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(3):347-353. DOI 10.18699/VJ17.252

Западная Сибирь – один из важнейших мировых регионов по производству пшеницы и обеспечению продовольственной безопасности населения Земли. Дальнейшее повышение урожайности пшеницы в мире усложняется тенденцией изменения климата, деградацией земель, потерей плодородия почвы и появлением новых вирулентных рас возбудителей болезней (Climat..., 2011).

В период с 2011 по 2016 г. Российская Федерация экспортировала в среднем 17.9 млн т пшеницы в год (<http://faostat.fao.org>). Положительная экспортная динамика пшеницы в России, безусловно, связана с внедрением в производство новых, более продуктивных сортов. Однако урожайность коммерческих сортов значительно варьирует по годам за счет огромных потерь их потенциала под влиянием неблагоприятных условий, прежде всего из-за засухи и поражения болезнями, в частности бурой, стеблевой ржавчиной и мучнистой росой. Ежегодные потери урожая могут достигать 30–40 % и более (Shamanin, Morgunov, 2009). Угроза проникновения на территорию России вирулентной расы *Ug99*, возбудителя стеблевой ржавчины, и активный формообразовательный процесс в популяциях патогена также несут серьезную угрозу производству зерна пшеницы, поскольку гены устойчивости к стеблевой ржавчине теряют свою эффективность (Шаманин и др., 2012, 2016; Shamanin et al., 2016).

Синтетические пшеницы с привлечением генетического потенциала *Aegilops tauschii* широко используются в селекционных программах, что способствует существенному расширению генотипического разнообразия исходного материала и получению новых форм пшеницы, устойчивых к биотическим и абиотическим стрессам. Синтетики служат как для сохранения, так и для использования генофонда диких сородичей в селекции пшеницы (Mujeeb-Kazi et al., 2008; Trethowan, Mujeeb-Kazi, 2008; Ogbonnaya et al., 2013).

Обычно синтетики получают путем искусственного скрещивания твердой пшеницы (*T. turgidum* ssp. *durum*; $2n = 28$, AABB) с эгилопом Тауша (*Ae. tauschii*; $2n = 14$, DD), донора D генома гексаплоидной пшеницы (*T. aestivum*; $2n = 42$, AABBDD) и последующего удвоения числа хромосом, и лишь небольшое число синтетиков создают с участием *T. dicoccoides* и *T. dicoccum* (Першина, 2014).

Гибридизация между синтетическими гексаплоидами и мягкой (гексаплоидной) пшеницей из-за равного числа хромосом осуществляется легче, чем скрещивание мягкой пшеницы с диплоидными и тетраплоидными дикорастущими видами, что позволяет получать ценные

рекомбинанты и отбирать генотипы с полезными агрономическими свойствами (Qi et al., 2007).

Начиная с середины восьмидесятых годов прошлого столетия было получено по всему миру более 1500 форм синтетической пшеницы, в том числе 900 на основе *Ae. tauschii*. Генетическое разнообразие генома D *Ae. tauschii* намного выше субгенома D мягкой пшеницы, в частности по устойчивости к основным листовым болезням и вредителям, биохимическому составу зерна (Dvorak et al., 1998).

В селекционных программах *Ae. tauschii* рассматривается как перспективный источник обогащения культурной пшеницы такими селекционно-ценными признаками, как высокие «масса 1000 зерен», «продуктивность главного колоса», «засухоустойчивость» и «высокое качество зерна» (Ogbonnaya et al., 2005; van Ginkel, Ogbonnaya, 2007). Результаты исследований показали, что полученные линии гексаплоидной синтетической пшеницы обладают устойчивостью ко многим абиотическим стрессам (засухе, высоким температурам, засоленности почв), они хорошо адаптировались по всему миру, особенно в засушливых условиях (Gill et al., 2006). Приоритетным направлением в селекции пшеницы является увеличение урожайности и элементов продуктивности синтетиков. Получены синтетические пшеницы с высокими показателями продуктивности главного колоса, массы 1000 зерен, большим количеством продуктивных растений с единицы площади (Cooper et al., 2012; Cooper, 2013).

Традиционная стратегия использования синтетических пшениц в селекции подразумевает дальнейшее скрещивание синтетиков с лучшими адаптивными сортами пшеницы с последующими беккроссами и получением синтетических беккроссных линий пшеницы с ценными рекомбинациями от донора генома D (Mujeeb-Kazi et al., 2000; Mujeeb-Kazi, Delgado, 2001). Как правило, для синтетиков на основе *T. durum* достаточно одного-двух беккроссов для получения линий с желаемыми агрономическими признаками (Trethowan, van Ginkel, 2009).

В настоящее время требуются дальнейшее секвенирование генома синтетических пшениц, идентификация полезных генов в гермоплазме *Ae. tauschii* и их интродукция в геном мягкой пшеницы, а также совершенствование стратегии использования синтетических пшениц в селекционных программах. В связи с этим реализация огромного генетического потенциала, которым обладают синтетические пшеницы, во многом зависит от тщательного изучения фенотипов синтетиков в разных почвенно-климатических условиях.

Цель наших исследований – оценить и выделить наиболее ценные линии гексаплоидной синтетической пшеницы с геном *Ae. tauschii* для селекции в условиях Западной Сибири.

Материалы и методы

На опытном поле Омского ГАУ в 2016 г. проведено изучение линий гексаплоидной синтетической пшеницы селекции CIMMYT (питомник 16-SYNT-PYT), созданных скрещиванием сортов твердой пшеницы селекции Селекционно-генетического института (г. Одесса, Украина) и сорта Pandur (Румыния) (*Triticum durum* Desf., геном AB) с эгилопсом Тауша (*Aegilops tauschii* Coss., syn. *Aegilops squarrosa*, геном D), а также 15 линий синтетической пшеницы селекции Киотского университета (Япония), полученных скрещиванием сорта твердой пшеницы Langdon (США) с формами эгилопса различного экологического происхождения. Всего изучено 126 линий.

Каждую линию высевали по одному погонному метру, через пять номеров поочередно размещали контроль № 1 (среднеранний сорт Памяти Азиева) и контроль № 2 (среднепоздний сорт Серебристая).

В течение вегетации растений проводили фенологические наблюдения, иммунологическую оценку степени и типа устойчивости растений (в динамике, не менее четырех-пяти учетов) по следующим болезням: мучнистой росе – по общепринятой методике (Захаренко и др., 2000); бурой, стеблевой ржавчине и септориозу – по международной шкале CIMMYT (Койшибаев и др., 2014). Расчет площади под кривой развития болезни (мучнистой росы, бурой и стеблевой ржавчины), ПКРБ, проводили по методу Джонсона и Вилкинсона (Сочалова, Лихенко, 2011).

На основе ПКРБ определяли индекс устойчивости (ИУ) сортов пшеницы к основным патогенам (Дьяков, 2003) по формуле:

$$RI = \frac{AUDPC_{\text{variety}}}{AUDPC_{\text{control}}}$$

Если индекс находится в пределах 0.10–0.35, сорт считается высокоустойчивым, 0.36–0.65 – среднеустойчивым, 0.66–0.80 – слабоустойчивым, 0.81 – восприимчивым.

Достоверность различий от стандартного сорта, коэффициенты вариации рассчитывали по методике Б.А. Доспехова (1985) с использованием программы Excel.

Результаты

Вегетационный период. Данные по варьированию периода «всходы–колошение» у линий синтетической пшеницы приведены в табл. 1. Полученные результаты опыта свидетельствуют о том, что по продолжительности межфазного периода «всходы–колошение», который тесно коррелирует с общей длиной вегетационного периода, между линиями внутри каждой гибридной комбинации были существенные различия.

Коэффициент вариации в различных комбинациях скрещивания составлял от 3.1 до 15.9 %. В целом по всем испытанным линиям варьирование данного периода было в пределах от 35 до 68 сут. Выделены линии, у которых период «всходы–колошение» соответствовал западносибирским сортам яровой мягкой пшеницы – от среднеран-

него типа (стандарт Памяти Азиева) до среднепозднего (стандарт Серебристая). Сорта позднеспелого типа (более 44 сут) в Западной Сибири не возделываются, так как они, преимущественно, не созревают до наступления ранних осенних заморозков. В связи с этим синтетические линии с поздним периодом выколашивания могут представлять селекционный интерес только как источники других признаков: «качество зерна», «устойчивость к болезням» и др.

Отмечен полиморфизм между синтетиками, полученными от различных форм *Ae. tauschii*. Особенно значимое влияние генома D прослеживается в комбинациях с сортом твердой пшеницы Aisberg. Например, линии в комбинации данного сорта с формой *Ae.sq.*(511) имели продолжительность периода от всходов до колошения на уровне средне-раннего стандарта Памяти Азиева (35–38 сут). Линии, полученные от скрещивания Aisberg с формой *Ae.sq.*(369), наоборот, оказались очень позднеспелыми, с периодом «всходы–колошение» от 51 до 59 сут. Полученные данные свидетельствуют о существенном влиянии генома D на продолжительность периода «всходы–колошение».

На основе сорта Ukr-Od 1530.94 получены линии из пяти гибридных комбинаций, в которых участвовали различные формы эгилопса: *Ae.sq.*(310), *Ae.sq.*(392), *Ae.sq.*(458), *Ae.sq.*(629), *Ae.sq.*(1027).

Размах варьирования средних значений продолжительности рассматриваемого периода между этими комбинациями составил восемь дней, от 44 до 52. Внутри одной комбинации между линиями различия по продолжительности периода «всходы–колошение» достигали 13 дней, например в комбинациях Ukr-Od 1530.94 с *Ae.sq.*(310), *Ae.sq.*(392), *Ae.sq.*(1027). Коэффициент вариации в этих комбинациях по периоду «всходы–колошение» составил: с *Ae.sq.*(392) – 15.9, *Ae.sq.*(310) – 13.5 %. Также высокой изменчивостью признака внутри комбинаций с сортом Langdon отличались линии из Японии – варьирование данного признака составило 13.5 %.

Таким образом, геномы D, переданные гибридам от форм эгилопса *Ae.sq.*(310), *Ae.sq.*(392), *Ae.sq.*(1027) и японских форм, обуславливают высокий полиморфизм по продолжительности периода от всходов до колошения.

Частота встречаемости изученных линий ярового типа по продолжительности периода «всходы–колошение» представлена на рис. 1. Большинство изучаемых линий выколашивались позднее среднепозднего стандарта (68 % линий). На уровне среднепозднего стандарта Серебристая – 24 и среднераннего – Памяти Азиева – 9 % линий.

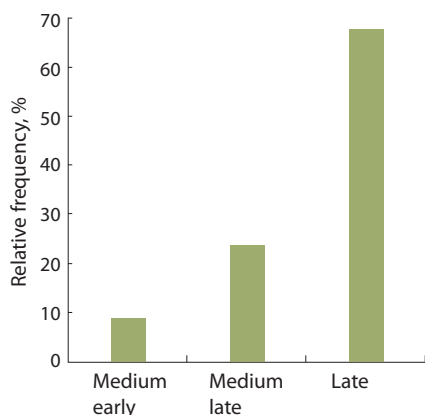
В комбинациях сортов твердой пшеницы Pandur и Leuc 84693 с *Ae.sq.*(409) линии имели в основном озимый тип развития. В изучаемых гибридных комбинациях выколосилось лишь по одной линии, при этом продолжительность изучаемого периода данных линий была практически равной и составила в комбинации Leuc 84693 с *Ae.sq.*(409) 51 сут, а Pandur с *Ae.sq.*(409) – 53 сут. Только озимый тип развития наблюдался у линий в гибридных комбинациях Ukr-Od 761.93/*Ae.sq.*(392) и Leuc 84693/*Ae.sq.*(1026).

Как было отмечено выше, линии в гибридной комбинации Aisberg/*Ae.sq.*(369) имеют очень позднее колошение, в среднем 56 сут. Линия гибридной комбинации Aisberg/*Ae.sq.*(369)/Demig имела продолжительность изучаемого

Table 1. Variation of the germination–earling interval in synthetic wheat lines

Parental forms		Number of lines	Variation range, days	X, mean $\pm$ S _x	Coefficient of variation
♀	♂				
<i>T. durum</i> variety	<i>Ae. tauschii</i> accession				
Aisberg	<i>Ae.sq.</i> (369)	8	51–59	56 $\pm$ 1.13	5.8
	<i>Ae.sq.</i> (511)	9	35–38	36 $\pm$ 0.38	3.1
Ukr-Od 1530.94	<i>Ae.sq.</i> (310)	3	42–55	44 $\pm$ 3.25	13.5
	<i>Ae.sq.</i> (392)	6	39–52	44 $\pm$ 2.85	15.9
	<i>Ae.sq.</i> (458)	6	44–52	47 $\pm$ 1.88	9.9
	<i>Ae.sq.</i> (629)	7	48–54	52 $\pm$ 1.08	5.6
	<i>Ae.sq.</i> (1027)	20	42–55	47 $\pm$ 0.95	9.0
Pandur	<i>Ae.sq.</i> (223)	18	48–55	52 $\pm$ 1.16	9.6
	<i>Ae.sq.</i> (409)	13	–	53*	–
Leuc 84693	<i>Ae.sq.</i> (409)	5	–	51*	–
Ukr-Od 952.92	<i>Ae.sq.</i> (1031)	8	45–55	51 $\pm$ 1.59	8.8
Langdon	Form of <i>Ae.sq.</i> (Japan)	15	42–68	54 $\pm$ 1.86	13.5
Ukr-Od 761.93	<i>Ae.sq.</i> (392)	6	Winter type	–	–
Leuc 84693	<i>Ae.sq.</i> (1026)	1	Winter type	–	–
Pamyati Azieva (medium early standard)		–	Spring type	37 $\pm$ 0.37	3.5
Serebristaya (medium late standard)		–	Spring type	44 $\pm$ 0.27	2.1
LSD ₀₅				1.0	

* One line of the spring growth habit is chosen from the hybrid combination; S_x, error of the mean.

**Fig. 1.** Prevalence of germination–earling intervals in synthetic wheat lines averaged over hybrid combinations.

межфазного периода на уровне среднепозднего стандарта Серебристая (45 сут), что, вероятно, обусловлено результатом дополнительного скрещивания с сортом Demir. Позднеспелые формы синтетиков рекомендуются в селекцию как источники ценных признаков при скрещивании с яровыми сортами, возделываемыми в регионе.

Оценка на устойчивость к грибным болезням. Для реализации потенциала сортов в условиях Западной Сибири немаловажное значение имеет устойчивость к поражению грибными болезнями.

Один из показателей, позволяющий классифицировать сорта по уровню частичной устойчивости к болезни, – индекс устойчивости. Между синтетиками наблюдался значительный полиморфизм по индексу устойчивости к основным листовым патогенам (табл. 2).

В гибридных комбинациях с участием сорта твердой пшеницы Ukr-Od 1530 и разных форм эгилопса отмечено варьирование индекса устойчивости к мучнистой росе (0–0.9), бурой ржавчине (0–1.0) и стеблевой ржавчине (0–1.0). Наибольший полиморфизм по индексу устойчивости к мучнистой росе отмечен в гибридных комбинациях с образцами *Ae.sq.*(392), *Ae.sq.*(511), *Ae.sq.*(629), *Ae.sq.*(1031) и японскими формами *Ae. tauschii* (индекс устойчивости 0.1–1.0). По устойчивости к бурой ржавчине полиморфность по данному показателю была характерна для линий с участием *Ae.sq.*(392), *Ae.sq.*(1027) и *Ae.sq.*(1031) (индекс устойчивости 0–0.9) и по устойчивости к стеблевой ржавчине – для линий с участием *Ae.sq.*(629) и *Ae.sq.*(1027) (индекс устойчивости 0.1–1.0). Гибридные комбинации, полученные от скрещивания сорта твердой пшеницы Aisberg с формой *Ae.sq.*(369), Ukr-Od 1530 с *Ae.sq.*(310) и Pandur с *Ae.sq.*(223), характеризуются наибольшей долей линий с комплексной устойчивостью к мучнистой росе, бурой и стеблевой ржавчине (ИУ составил 0–0.5 в среднем по гибридной комбинации). У большинства линий отмечена высокая и умеренная устойчивость к ржавчинным болезням, поражение варьировало от 5 до 70 %, поражение мучнистой росой составило 10–90 %. Стандартные сорта Памяти Азиева и Серебристая в значительной степени поражались мучнистой росой – 90 %, бурой ржавчиной – 80 и 90 % и стеблевой ржавчиной – 80 % соответственно. На фоне сильного поражения стандартных сортов мучнистой росой 87 % синтетических линий ярового типа развития имели высокую и среднюю устойчивость, 10 % – среднюю восприимчивость и 3 % – восприимчивость (рис. 2).

Table 2. Variation of resistance to leaf pathogens in synthetic wheat lines

Parental forms		Number of lines	Resistance index, ranges		
♀	♂		Powdery mildew	Leaf rust	Stem rust
Variety <i>T. durum</i>	Sample <i>Ae. tauschii</i>				
Aisberg	<i>Ae.sq.</i> (369)	8	0–0.1	0.2–0.5	0.2–0.5
	<i>Ae.sq.</i> (511)	9	0.1–0.7	0.2–0.5	0.1–0.4
Ukr-Od 1530.94	<i>Ae.sq.</i> (310)	3	0–0.2	0.1–0.4	0.2–0.5
	<i>Ae.sq.</i> (392)	6	0.1–0.7	0.3–0.9	0.1–0.4
	<i>Ae.sq.</i> (458)	6	0.5–0.9	0.3–0.7	0.2–0.5
	<i>Ae.sq.</i> (629)	7	0.1–0.7	0–0.2	0.1–0.7
	<i>Ae.sq.</i> (1027)	20	0.1–0.6	0.1–0.8	0.1–1.0
	<i>Ae.sq.</i> (223)	18	0.1–0.3	0.3–0.5	0.1–0.2
Pandur	<i>Ae.sq.</i> (409)*	13	0.1	0.4	0.5
Leuc 84693	<i>Ae.sq.</i> (409)*	5	0.1	0.6	0.3
Ukr-Od 952.92	<i>Ae.sq.</i> (1031)	8	0.1–0.7	0.1–0.7	0.3–0.5
Langdon	Form of <i>Ae.sq.</i> (Japan)	15	0–0.9	0.1–0.5	0.1–0.4
Pamyati Azieva (medium early standard)		–	0.8	1.0	1.0
Serebristaya (medium late standard)		–	0.9	0.9	1.1

* One line of the spring growth habit is chosen from the hybrid combination.

Высокую и среднюю устойчивость (поражение в пределах 0–20 %) к бурой ржавчине проявили 92 % линий синтетической пшеницы ярового типа развития, среднюю восприимчивость – 5 % и восприимчивость – 3 %. Высокую и среднюю устойчивость (поражение в пределах 0–20 %) синтетической пшеницы к стеблевой ржавчине показали 95 % яровых линий, среднюю восприимчивость – 2 % (поражение до 50 %) и восприимчивость – 3 %. Характеристика лучших синтетиков, выделенных по устойчивости к листовым патогенам, представлена в табл. 3.

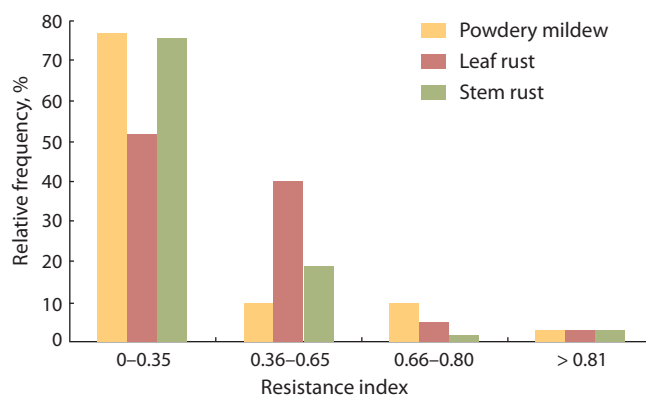
Расчет площади под кривой развития болезни показал, что интенсивность развития болезней у линий-синтетиков была в 2–8 раз ниже, чем у стандартов.

Высокой комплексной устойчивостью к трем возбудителям болезней отличаются линии ярового типа развития гибридных комбинаций: Ukr-Od 1530.94/*Ae.sq.* (392); Ukr-Od 1530.94/*Ae.sq.*(629); Ukr-Od 1530.94/*Ae.sq.*(1027); Langdon/Ku-2074; Langdon/Ku-2075; Langdon/Ku-2100; Langdon/Ku-2079 (ИУ варьирует от 0 до 0.4). Линии Aisberg/*Ae.sq.*(369); Ukr-Od 952.92/*Ae.sq.*(1031); Pandur/*Ae.sq.* (223) и Langdon/Ku-2100 также характеризуются как умеренно устойчивые к септориозу (3–4 балла).

Выделенные линии рекомендуется использовать в качестве исходного материала для селекции на устойчивость в условиях Западной Сибири.

Обсуждение

В пределах изученных линий синтетиков выявлены значительные генотипические различия по продолжительности вегетационного периода. Линии гибридной комбинации Aisberg/*Ae.sq.*(511) характеризовались как наиболее скороспелые генотипы изучаемых линий. В полевых условиях поражение этих линий бурой и стеблевой ржавчиной

**Fig. 2.** Relative pest resistance in synthetic wheat line.

варьировало от 5 до 30 %, две линии были иммунны к стеблевой ржавчине, что свидетельствует о хорошей их перспективе в качестве исходного материала.

Полиморфизм по периоду «всходы–колошение» отмечен у линий в гибридных комбинациях Ukr-Od 1530.94 с *Ae.sq.*(310), *Ae.sq.*(392), *Ae.sq.*(1027), а также у линий из Японии. Скрещивание сортов твердой пшеницы с образцом *Ae.sq.*(409) обуславливает в основном озимый тип развития растений.

Линии с наиболее коротким периодом от всходов до колошения целесообразно использовать непосредственно для дальнейшей оценки в питомниках в селекционном процессе по комплексу хозяйственно ценных признаков. Позднеспелые линии, выделяющиеся по устойчивости к болезням, также представляют интерес для практической селекции в качестве источников ценных признаков.

Table 3. Pest resistance in the best synthetic hexaploid wheat lines

Sample No.	Variety, line	Powdery mildew			Leaf rust			Stem rust			Wheat leaf blotch, score
		%	AUDPC	RI	%/ type	AUDPC	RI	%/ type	AUDPC	RI	
Medium early											
1	Pamyati Azieva, St	90	1450	0.8	80S	1530	1.0	80S	585	1.0	9
30	Ukr-Od 1530.94/ <i>Ae.sq.</i> (392)	10	210	0.2	30MS	442.5	0.4	15M	70	0.1	9
55	Aisberg/ <i>Ae.sq.</i> (511)	30	630	0.5	30MS	610	0.5	R	0	0	7
113	Aisberg/ <i>Ae.sq.</i> (511)	30	630	0.3	20MS	490	0.4	20MS	250	0.4	9
Medium late											
7	Serebristaya, St	90	1710	0.9	90S	1195	0.9	80S	665	1.1	9
52	Langdon/Ku-48042	0	0	0	40MS	690	0.4	20M	80	0.1	6
121	Ukr-Od 1530.94/ <i>Ae.sq.</i> (1027)	0	0	0	15MR	292.5	0.2	10MS	60	0.1	9
Late											
48	Ukr-Od 1530.94/ <i>Ae.sq.</i> (1027)	0	0	0	R	0	0	50S	169	0.3	7
68	Aisberg/ <i>Ae.sq.</i> (369)	0	0	0	40MS	560	0.5	40M	140	0.2	3
69	Ukr-Od 1530.94/ <i>Ae.sq.</i> (629)	10	100	0.1	R	0	0	20M	60	0.1	7
75	Ukr-Od 1530.94/ <i>Ae.sq.</i> (629)	10	210	0.2	R	0	0	5M	30	0.1	6
77	Ukr-Od 1530.94/ <i>Ae.sq.</i> (310)	30	410	0.3	40MS	507.5	0.4	20MS	125	0.2	7
86	Ukr-Od 952.92/ <i>Ae.sq.</i> (1031)	0	0	0	20MR	445	0.4	10MS	125	0.2	4
112	Pandur/ <i>Ae.sq.</i> (223)	30	570	0.5	40MS	545	0.4	20M	84	0.1	3
21	Langdon/Ku-2074	10	180	0.1	5MR	15	0	20MS	40	0.1	5
32	Langdon/Ku-2075	10	100	0.1	20MR	147.5	0.1	20MS	60	0.1	5
74	Langdon/Ku-2097	50	610	0.5	10MR	152.5	0.1	40S	100	0.2	6
108	Langdon/Ku-2100	10	180	0.2	10M	117.5	0.1	40S	140	0.2	3
109	Langdon/Ku-2079	0	0	0	20M	215	0.2	60S	205	0.3	9

Designations: %/type (leaf and stem rust), the area of the leaf surface occupied with pustules (percentage) and the type of resistance/susceptibility; % (powdery mildew), the severity area of the plant surface (percentage). Types of resistance/susceptibility: S, complete susceptibility; MS, moderate susceptibility; MR, moderate resistance; M, intermediate resistance; R, complete resistance.

Полевая оценка линий синтетиков в условиях южной лесостепи Западной Сибири показала, что линии синтетиков представляют большой интерес в качестве исходного материала в селекции на устойчивость к грибным болезням. Большинство линий синтетиков характеризуются высокой и средней устойчивостью к грибным болезням. Поражение синтетиков бурой и стеблевой ржавчиной варьировало от 5 до 70 %, поражение мучнистой росой – от 10 до 90 %. Наибольший полиморфизм генома D по устойчивости к грибным болезням проявляется в гибридных комбинациях с образцами *Ae.sq.*(392), *Ae.sq.*(629), *Ae.sq.*(1027) и *Ae.sq.*(1031).

Влияние генома D образца *Ae.sq.*(369) в комбинации с сортом твердой пшеницы Aisberg; *Ae.sq.*(310) с сортом Ukr-Od 1530 и *Ae.sq.*(223) с Pandur обуславливает комплексную устойчивость к грибным болезням.

Скорость развития патогена мучнистой росы, бурой и стеблевой ржавчины у синтетиков была в два-восемь раз ниже, чем у восприимчивых стандартов. Отдельные линии

проявили гетерогенность по устойчивости к листовым патогенам, эти линии требуют дальнейшего изучения и отборов устойчивых растений.

Линии, полученные скрещиванием сорта Ukr-Od 1530.94 твердой пшеницы (Украина) и образцов *Ae. tauschii* (392); (629); (1027); (1031), а также линии селекции Киотского университета Langdon/Ku-2074; Langdon/Ku-2075; Langdon/Ku-2100; Langdon/Ku-2079 отличаются высокой комплексной устойчивостью к мучнистой росе, бурой и стеблевой ржавчине.

В результате фенотипирования линий синтетической пшеницы обнаружены уникальные по хозяйственно ценным признакам формы, являющиеся ценным исходным материалом для селекционных программ, который позволит расширить генотипическое разнообразие создаваемых сортов с привлечением диких сородичей пшеницы. Высокий генетический потенциал синтетической пшеницы по устойчивости к биотическим стрессам составляет еще недостаточно использованный резерв для создания

адаптивных сортов с целью повышения стабильности производства зерна пшеницы на фоне потепления климата и возрастания эпидемий болезней.

Acknowledgments

This work was supported by the Russian Science Foundation, project 16-16-10005. The authors are grateful to the International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT) for the material provided for the study.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Climat change and crop production. CABI Climat Change Series. 2011;1:292.
- Cooper J.K. Synthetic Hexaploid Wheat as a Source of Improvement for Winter Wheat (*Triticum aestivum* L.) in Texas. Texas A&M University, 2013.
- Cooper J.K., Ibrahim A., Rudd J., Malla S., Hays D.B., Baker J. Increasing hard winter wheat yield potential via synthetic wheat: I. Path-coefficient analysis of yield and its components. *Crop Sci.* 2012;52:2014-2022.
- D'jakov Ju.T. Tipy ustoychivosti rasteniy i ikh prakticheskoe ispol'zovanie [Types of plant resistance and their practical using]. Tipy ustoychivosti rastenij k boleznyam [Types of plant resistance]. St. Petersburg: VIZR Publ., 2003;5-9. (in Russian)
- Dospekhov B.A. Metodika polevogo opyta (s osnovami statisticheskoy obrabotki rezul'tatov issledovaniy). [Methods of field experiment and the basics of the statistical evaluation of results]. Moscow: Kolos Publ., 1985. (in Russian)
- Dvorak J., Luo M.C., Yang Z.L., Zhang H.B. The structure of the *Aegilops* gene pool and evolution of hexaploid wheat. *Theor. Appl. Genet.* 1998;97:657-670. DOI 10.1007/s001220050942.
- Gill B.S., Friebe B., Raupp W.J., Wilson D.L., Cox T.S., Sears R.G., Brown-Guedira G.L., Fritz A.K. Wheat genetic resource center: the first 25 years. *Adv. Agr.* 2006;89:73-136.
- Koishybaev M., Shamanin V.P., Morgunov A.I. Skrining pshenitsy na ustoychivost' k osnovnym boleznyam: metodicheskie ukazaniya [Screening wheat for resistance to major diseases: guidelines]. Ankara: FAO-SEK Publ., 2014. (in Russian)
- Mujeeb-Kazi A., Delgado R. A second, elite set of synthetic hexaploid wheats based upon multiple disease resistance. *Ann. Wheat Newslett.* 2001;47:114-116.
- Mujeeb-Kazi A., Fuentes-Davila G., Delgado R., Rosas V., Cano A., Cortes S., Juarez L., Sanchez J. Current status of D-genome based, synthetic, hexaploid wheats and the characterization of an elite subset. *Ann. Wheat Newslett.* 2000;46:76-79.
- Mujeeb-Kazi A., Gul A., Farooq M., Rizwan S., Ahmad I. Rebirth of synthetic hexaploids with global implications for wheat improvement. *Austral. J. Agr. Res.* 2008;59:391-398.
- Ogbonnaya F.C., Abdalla O., Mujeeb-Kazi A., Kazi A.G., Xu S.S., Gosman N., Lagudah E.S. Synthetic hexaploids harnessing species of primary gene pool for wheat improvement. *J. Plant Breed. Rev.* 2013;37:35-122.
- Ogbonnaya F.C., Halloran G.M., Lagudah E.S. D genome of wheat-60 years on from Kihara, Sears and McFadden. Ed. K. Tsunewaki. *Frontiers of Wheat BioScience*. (Kihara Memorial Yokohama Foundation for the Advancement of Life Sciences). Yokohama, Japan, 2005.
- Pershin L.A. Chromosomal engineering of plants: a branch of biotechnology. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2014;18(1):138-146. (in Russian)
- Qi L., Friebe B., Zhang P., Gill B.S. Homoeologous recombination, chromosome engineering and crop improvement. *Chromosome Res.* 2007;15:3-19.
- Shamanin V., Morgunov A. Spring wheat breeding in Western Siberia for resistance to leaf and stem rust. 12th Int. Cereal Rusts and Powdery Mildews Conf. Antalya, Turkey, 13-16 October. 2009;82.
- Shamanin V.P., Morgunov A.I., Manes J., Zelenskiy Y.I., Chursin A.S., Levshunov M.A., Pototskaya I.V., Likhnenko I.E., Manko T.A., Karakoz I.I., Tabachenko A.V., Petukhovskiy S.L. Breeding and genetics estimation of spring wheat population of Siberian shuttle breeding nursery of CIMMYT. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2012;6(1):21-32. (in Russian)
- Shamanin V.P., Pototskaya I.V., Klevakina M.V. Estimation of the spring bread wheat Siberian collection for resistance to stem rust in the southern forest steppe of West Siberia. *Vestnik Kazanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta* = Proceedings of the Kazan State Agrarian University. 2016;2(11):55-59. (in Russian)
- Shamanin V., Salina E., Wanyera R., Zelenskiy Y., Olivera P., Morgunov A. Genetic diversity of spring wheat from Kazakhstan and Russia for resistance to stem rust Ug99. *Euphytica*. 2016;212(2):287-296.
- Sochalova L.P., Likhnenko I.E. Geneticheskaya ustoychivost' sortov yarovoy pshenitsy k obligatno-aerogennym zabolevaniyam v usloviyakh lesostepi Priob'ya [The genetic resistance of spring wheat varieties to obligate airborne diseases in the forest-steppe of the Ob' region]. Novosibirsk: SibNIIRS Publ., 2011. (in Russian)
- Trethowan R.M., Mujeeb-Kazi A. Novel germplasm resources for improving environmental stress tolerance of hexaploid wheat. *Crop Sci.* 2008;48:1255-1265.
- Trethowan R.M., van Ginkel M. Synthetic wheat an emerging genetic resource. *Wheat Sci. Trade*. Ed. B. Carver. Wiley-Blackwell, Ames, IA, 2009;369-386.
- Van Ginkel M., Ogbonnaya F. Novel genetic diversity from synthetic wheats in breeding cultivars for changing production conditions. *Field Crops Res.* 2007;104:86-94.
- Zaharenko V.A., Medvedev A.M., Erohina S.A., Kovalenko E.D., Dobrovol'skaja G.V., Mihajlov A.A. Metodika po otsenke ustoychivosti sortov polevykh kul'tur k boleznyam na infektsionnykh i provokatsionnykh fonakh [The methodology for evaluation of pest resistance in crops varieties on infectious and provocative backgrounds]. Moscow: Rossel'khozakademiya Publ., 2000. (in Russian)

Изменчивость и межпопуляционная дифференциация редкого вида *Gueldenstaedtia monophylla* Fisch. (Fabaceae)

И.Ю. Селютин[✉], Е.С. Кониченко, О.В. Дорогина

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

В работе изучена генетическая изменчивость редкого вида гюльденштедтии однолистной (*Gueldenstaedtia monophylla*) из семи природных популяций в центральной части ее ареала (Онгудайский район Республики Алтай). Для характеристики генетического разнообразия этого реликтового вида как на видовом, так и на популяционном уровне был использован SDS-электрофорез запасных белков семян. Полипептидные спектры семян содержали от 17 до 32 белковых компонентов, из которых 28 были полиморфными. В популяциях *G. monophylla* выявлен достаточно высокий уровень генетического полиморфизма, величина индекса генетического сходства внутри изученных популяций варьировала от 0.673 до 0.813. Наибольшая изменчивость запасных белков семян установлена в популяциях Инегень (0.673) и Малая Иня (0.734). Самый низкий уровень изменчивости полипептидных спектров выявлен в популяции Большой Яломан (0.813). Генетическая дистанция Nei между изученными популяциями составила 0.018–0.215, наибольшая дистанция по белковым спектрам (0.215) найдена между популяциями Инегень и Малая Иня. Популяция Инегень – наиболее удаленная от других изученных нами популяций, дистанция Nei между этой популяцией и всеми остальными варьирует от 0.113 до 0.215. С помощью анализа молекулярной дисперсии AMOVA установлено, что доля внутрипопуляционной изменчивости составляет 53 %, а межпопуляционной – 47 %. Возможно, достаточно высокое генетическое разнообразие в популяциях *G. monophylla* обеспечивается и поддерживается за счет таких биологических особенностей вида, как перекрестное опыление, большая продолжительность жизни и длительный репродуктивный период. Результаты исследования показывают, что некоторые редкие виды способны поддерживать значительное генетическое разнообразие даже при небольшом размере популяций. Судя по достаточно высокому уровню генетической изменчивости гюльденштедтии однолистной, можно предположить, что в настоящее время генетический дрейф и инбридинг не представляют угрозы для ее выживания. При разработке охранных мероприятий для данного вида основное внимание следует уделить сокращению антропогенной нагрузки в местах произрастания популяций и предотвращению разрушения местообитаний *G. monophylla*.

Ключевые слова: генетическое разнообразие; редкий вид; *Gueldenstaedtia monophylla*; SDS-электрофорез; полиморфизм запасных белков семян.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Селютин И.Ю., Кониченко Е.С., Дорогина О.В. Изменчивость и межпопуляционная дифференциация редкого вида *Gueldenstaedtia monophylla* Fisch. (Fabaceae). Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017; 21(3):354-359. DOI 18699/VJ16.15-o

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Selyutina I.Yu., Konichenko E.S., Dorogina O.V. Variability and interpopulation differentiation of the rare species *Gueldenstaedtia monophylla* Fisch. (Fabaceae). Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(3):354-359. DOI 18699/VJ16.15-o

Variability and interpopulation differentiation of the rare species *Gueldenstaedtia monophylla* Fisch. (Fabaceae)

I.Yu. Selyutina[✉], E.S. Konichenko, O.V. Dorogina

Central Siberian Botanical Garden SB RAS, Novosibirsk, Russia

Genetic variability of the rare species *Gueldenstaedtia monophylla* from 7 natural populations in the central part of its range (Ongudai district, Altai Republic) was studied. To characterize the genetic diversity of this rare relict species at the population level, SDS-electrophoresis of seed storage proteins was used. Polypeptide spectra of seeds contained from 17 to 32 protein components, of which 28 were polymorphic. The populations of *G. monophylla* were revealed to have a sufficiently high level of genetic polymorphism, the genetic similarity index within the populations studied ranged from 0.673 to 0.813. The highest variability of seed storage proteins was found in the populations Inegen (0.673) and Malaya Inya (0.734). The lowest level of variability of the polypeptide spectra was in the population Bol'shoy Yaloman (0.813). The Nei genetic distance between the populations studied was 0.018–0.215, the greatest distance in the protein spectra was found between Inegen and Malaya Inya (0.215). Inegen was the most remote from the other populations, the Nei distance between this population and all other populations varying from 0.113 to 0.215. With AMOVA, it was found that the share of intra-population variability is 53 % and inter-population, 47 %. Perhaps this high genetic diversity in populations of *G. monophylla* is provided and maintained by such biological characteristics of the species as cross-pollination, high life expectancy and a long reproductive period. The results of our study suggest that some rare species are able to maintain high levels of genetic diversity, even in a small-size population. The relatively high level of genetic variability indicates that the current genetic drift and inbreeding do not pose a threat to the survival of the species.

Key words: genetic diversity; rare species; *Gueldenstaedtia monophylla*; SDS-electrophoresis; seed storage proteins polymorphism.

Генетическое разнообразие – один из биологических аспектов, имеющих огромное значение для разработки стратегий охраны редких и находящихся под угрозой исчезновения видов (Kallund, Jaaska, 2010; Gordon et al., 2012). Изучение генетического разнообразия вида служит научной основой для охраны его генофонда, а также для восстановления его генотипической структуры при реинтродукции (Журавлев и др., 1999). Уровень генетического разнообразия редких видов может существенно влиять на способность их популяций адаптироваться к изменениям окружающей среды и, следовательно, на их дальнейшее выживание (Примак, 2002; Frankham et al., 2002). Невозможно оценить перспективы дальнейшего существования вида без знания генетической структуры его популяций (Frankham, 2003; Gordon et al., 2012; Lopes et al., 2014). Для поддержания генетического разнообразия в популяциях очень важен размер популяции (Frankham, 2005). Уменьшение размера популяции приводит к потере генетического полиморфизма, а также к генетическому дрейфу и инбридингу (Lande, 1993; Kallund, Jaaska, 2010). Результаты многочисленных исследований аллозимной изменчивости (Hamrick, Godt, 1990, 1996) и более поздних работ на основе таких маркеров ДНК, как RAPD, AFLP, ISSR и SSR, показали, что генетическое разнообразие видов, представленных маленькими изолированными популяциями, как правило, ниже, чем у широко распространенных видов (Willi et al., 2006; Li et al., 2012). В долгосрочной перспективе снижение генетической вариабельности в малых популяциях может привести к потере способности адаптироваться к изменениям окружающей среды. Поэтому оценка уровня и структуры генетического разнообразия особенно важна для успешного сохранения редких видов, представленных небольшими популяциями.

Gueldenstaedtia monophylla Fisch. (сем. Fabaceae Lindl.), гюльденштедтия однолистная – редкий вид, гемизндемик Центральной Азии, в пределах своего дизъюнктивного ареала вид представлен малочисленными, изолированными популяциями (Редкие и исчезающие растения Сибири, 1980). Вид встречается в горно-степном поясе Центрального, реже Юго-Восточного Алтая, а также в Туве и Монголии (Намзалов, 1986; Пяк, 2003; Zhu, 2004). Основной участок ареала расположен в Центральном Алтае, все современные местонахождения вида сосредоточены близ границы четвертичного оледенения (Красная книга РФ, 2008). По мнению А.И. Пяка (2003), *G. monophylla* имеет специфичный ареал, охватывающий аридные низкогорья и среднегорья Центральной Азии. Характер ареала, представленного изолированными, значительно удаленными друг от друга участками, по предположению автора, говорит о том, что эти местообитания – «сильно обедненные дериваты древней нагорно-ксерофитной растительности, которые господствовали здесь на сухих горных склонах до плейстоценового похолодания» (Пяк, 2003. С. 134).

Гюльденштедтия однолистная внесена в Красную книгу РФ (2008) в статусе – 3 (R) – редкий вид и в Красную книгу Монголии (Mongolian Red Book, 2013), категория редкости – B2ab (iii). В региональных сводках (Красная книга Республики Алтай, 1996; Красная книга Республики Тыва, 2002) вид отмечен в статусе 2 (U) – уязвимый таксон.

Цель настоящей работы – исследование генетической изменчивости и внутривидовой дифференциации редкого вида *G. monophylla* на основе полипептидных спектров запасных белков семян.

Материалы и методы

Изучение популяций и сбор семян из *G. monophylla* проводили в семи природных местообитаниях Онгудайского района Республики Алтай в 2006 г. Все популяции исследованы в петрофитных (т.е. каменистых) степях, расположенных на высоте 650–950 м над уровнем моря на склонах южной, юго-восточной и юго-западной экспозиций крутизной до 30° (рис. 1).

Сальджар (SAL). Правый берег р. Сальджар, близ устья (50°31'29.71" с.ш., 86°36'10.86" в.д.). Разнотравно-холоднопопынная степь с *Caragana pygmaea* (L.) DC. на мелкощебнистом склоне южной экспозиции крутизной до 20°, общее проективное покрытие (ОПП) – 7 %, проективное покрытие (ПП) *Gueldenstaedtia monophylla* – 2 %. В травостое доминируют *Artemisia frigida* Willd., *Potentilla acaulis* L., *Panzerina lanata* (L.) Sojak, *Thymus mongolicus* (Ronn.) Ronn., *Polygala tenuifolia* Willd.

Большой Ильгумень (ILG). Левый берег реки Большой Ильгумень, 2 км от устья (50°36'32.22" с.ш., 86°30'24.64" в.д.). Сильно закустаренная разнотравно-злаковая степь, с выходами камней на склоне юго-восточной экспозиции крутизной 20–25° на высоте 750 м над уровнем моря. ОПП составляет 40 %, ПП *Gueldenstaedtia monophylla* – 1 %. В травяном покрове доминируют *Elytrigia geniculata* (Trin.) Nevski, *Koeleria cristata* (L.) Pers., *Carex supina* Willd. ex Wahlenb., *Potentilla acaulis*, *Artemisia frigida*; в кустарниковом ярусе представлены *Caragana pygmaea*, *Cotoneaster melanocarpus* M. Pop., *Berberis sibirica* Pall., *Spiraea trilobata* L., *S. hypericifolia* L.

Чуй-Оозы (ЧО). Окрестности природно-хозяйственного предприятия «Чуй-Оозы» в 3 км от устья р. Чуя (50°24'03.08" с.ш., 86°40'44.82" в.д.). Закустаренная ковыльно-ирисово-осочковая степь со скальными выходами на юго-восточном склоне крутизной до 30° на высоте 840 м над уровнем моря. Общее проективное покрытие около 30 %, ПП *Gueldenstaedtia monophylla* – 1–2 %. Доминируют *Carex supina*, *Iris potaninii* Maxim., *Stipa capillata* L. Кустарниковый ярус имеет ПП = 5 % и представлен *Brachanthemum baranovii* (Krasch. & Poljak.) Krasch., *Caragana pygmaea*, *Spiraea trilobata* и *Pentaphylloides parvifolia* (Fisch. ex Lehm.) Sojak.

Большой Яломан (BJL). Правый берег р. Большой Яломан, 3 км от устья (50°31'09.66" с.ш., 86°32'54.85" в.д.). Склон юго-восточной экспозиции крутизной 25°. Разнотравная степь с *Caragana pygmaea*. ОПП – 20 %, ПП *Gueldenstaedtia monophylla* – 2 %. Доминанты: *Dracocephalum peregrium* L., *Artemisia frigida*, *Ziziphora clinopodioides* Lam., *Echinops ruthenicus* M. Bieb., *Polygala sibirica*.

Малый Яломан (MJL). Окрестности с. Малый Яломан, левый берег р. Малый Яломан, 5 км от устья (50°29'09.56" с.ш., 86°34'40.41" в.д.). Разнотравная степь с *Caragana pygmaea* на каменистом склоне южной экспозиции, крутизной до 15–20°. Общее проективное покрытие – 25 %, ПП *Gueldenstaedtia monophylla* – 2 %. Преобладают *Artemisia frigida*, *Potentilla acaulis*, *Hedysarum gmelinii*

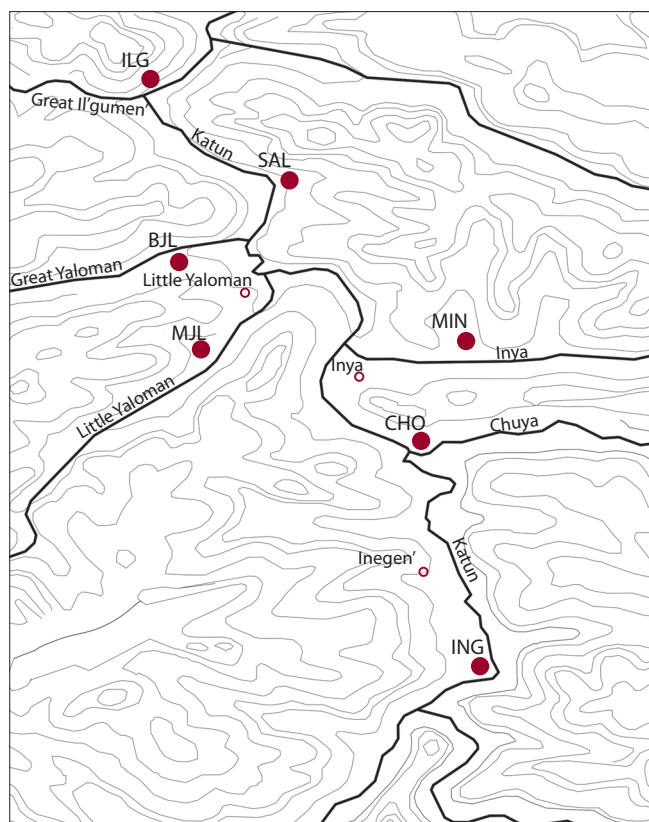


Fig. 1. Map of studied *G. monophylla* populations.

Ledeb., *Thymus mongolicus*, *Orostachis spinosa* (L.) C.A. Mey.

Инегень (ING). Устье р. Аргут, правый берег р. Аргут в 7 км от с. Инегень (50°14'48.93" с. ш., 86°40'56.78" в. д.). Разнотравная степь на каменистом склоне со скальными выходами южной экспозиции, крутизной до 15–20°. Общее проективное покрытие – 40 %, ПП *Gueldenstaedtia monophylla* – 2 %. Доминируют: *Thymus mongolicus*, *Pulsatilla turczaninowii* Kryl. & Serg., *Dracocephalum bungeanum* Schischk. & Serg., *Polygala sibirica* L. В кустарниковом ярусе представлены *Caragana pygmaea*, *Spiraea trilobata* и *Berberis sibirica*. В фитоценозе отмечены растения, занесенные в Красную книгу Российской Федерации (2008) и Красную книгу Республики Алтай (1996): *Euforbia rupestris* C.A. Mey, *Allium vodopjanovii* Friesen, *Astragalus stenoceras* C.A. Mey и *Astragalus macroceras* C.A. Mey.

Малая Иня (MIN). Окрестности с. Малая Иня (50°27'29.22" с. ш., 86°40'06.88" в. д.). Склон юго-западной экспозиции крутизной 5°. Бесстебельнолапчатково-холоднопопынная степь. ОПП – 30 %, ПП *Gueldenstaedtia monophylla* – до 1 %. В травостое доминируют *Artemisia frigida*, *Potentilla acaulis*, *Thymus mongolicus*, *Echinops ruthenicus*, *Panzerina lanata*.

Электрофорез проводили по методу U.K. Leammli (1970) с модификациями (Агафонов, Агафонова, 1992). Применяли 18 % разделяющий полиакриламидный и 5 % концентрирующий гели. Размер гелевых пластин 13–20 см, толщина – 1 мм. Для оценки электрофоретической подвижности полипептидных фракций использовали белковые маркеры с известной молекулярной массой

(«Fermentas», Литва). Электрофорез запасных белков проводили индивидуально для каждого семени, проанализировано по 23–46 семян из каждой популяции.

На основе полученных полипептидных спектров строили матрицы по наличию (1) или отсутствию (0) компонента. Для оценки уровня изменчивости белковых спектров в популяциях использовали индекс сходства (S), рассчитанный по формуле (Nei, Li, 1979):

$$S = 2n_{xy} / (n_x + n_y),$$

где $2n_{xy}$ – число общих электрофоретических полос, n_x – число электрофоретических полос у образца x , n_y – число полос у образца y .

Межпопуляционную изменчивость оценивали по коэффициенту генетической дистанции М. Nei (1972). Статистическую обработку данных и построение дендрограммы проводили с помощью программ POPGENE (Yeh et al., 1999) и GENALEX (Peakall, Smouse, 2012).

На уровень внутривидовой изменчивости могут оказывать влияние не только размер популяции и степень ее изолированности, но и плотность распределения особей (Chen et al., 2014; Wu et al., 2014). Поэтому дополнительно оценивали общую плотность и плотность генеративных особей в популяциях.

Результаты и обсуждение

В работе в качестве молекулярных маркеров использованы запасные белки семян, так как они – продукты экспрессии генов и могут давать информацию о структуре и состоянии соответствующих участков ДНК. Анализ белков семян *G. monophylla* показал достаточно высокую внутривидовую изменчивость белковых спектров. Все проанализированные полипептиды распределены преимущественно в диапазоне от 14 до 116 кДа. Белковые спектры состоят из 17–32 компонентов, из которых 28 (88 %) полиморфные. По электрофоретической подвижности их можно разделить на три зоны.

Зона 1 (66–116 кДа) включает от 3 до 4 интенсивно окрашенных компонентов и 5–8 с менее интенсивной окраской. В зоне 2 (25–35 кДа) присутствует от 2 до 4 интенсивно окрашенных компонентов и 3–7 слабоокрашенных. В зоне 3 (14–20 кДа) у разных образцов присутствует 6–10 компонентов.

Для оценки изменчивости белковых спектров на внутривидовом уровне использовали индекс сходства (S): чем больше значение коэффициента, тем меньше изменчивость в популяции. Самый низкий (0.813) уровень изменчивости полипептидных спектров обнаружен в популяции Большой Яломан (табл. 1).

Наибольшая изменчивость запасных белков семян выявлена в популяциях Инегень ($S = 0.673$) и Малая Иня ($S = 0.734$). Важным фактором, влияющим на уровень внутривидового разнообразия, является плотность генеративных особей в популяции (Masayuki, 2003). В нашем исследовании этот показатель не был скоррелирован с уровнем генетической изменчивости (см. табл. 1).

Результаты работы демонстрируют достаточно высокий уровень внутривидовой изменчивости у *G. monophylla* в сравнении с величинами, приведенными для других редких видов и видов с ограниченным распространением

Table 1. Population density and genetic variability in *G. monophylla* populations

Population	Overall density per m ²	Density of generative individuals per m ²	Number of polypeptide components	Similarity index S
Sal'dzhar	7.5	5.3	23–25	0.775 ± 0.201
Great Il'gumen'	17.0	11.1	20–24	0.809 ± 0.190
Chuy-Oozy	13.5	6.7	23–32	0.756 ± 0.234
Great Yaloman	9.8	5.5	17–23	0.813 ± 0.250
Little Yaloman	11.4	4.6	20–25	0.757 ± 0.232
Inegen	21.6	11.9	19–24	0.673 ± 0.280
Little Inya	20	10.4	20–27	0.734 ± 0.288

Table 2. Geographic and genetic distances between *G. monophylla* populations

Population	SAL	ILG	CHO	BJL	MJL	ING	MIN
SAL	–	8	19	6	8	19	6
ILG	0.018	–	25	11	16	31	20
CHO	0.136	0.133	–	16	11	7	6
BJL	0.054	0.070	0.078	–	4	18	9
MJL	0.066	0.075	0.142	0.075	–	14	4
ING	0.161	0.174	0.200	0.198	0.113	–	11
MIN	0.090	0.082	0.079	0.064	0.123	0.215	–

Supradiagonal values are geographic distances between corresponding populations, km; subdiagonal values are Nei's genetic distances.

(Gitzendanner, Soltis, 2000). Полученные нами данные согласуются с результатами исследований, показывающих, что некоторые редкие и исчезающие виды могут поддерживать высокий уровень генетического разнообразия даже при малых размерах их популяций (Rossetto et al., 1995; Ci et al., 2008; Gordon et al., 2012; Zhao et al., 2012; Chen et al., 2014; Wu et al., 2014).

С нашей точки зрения, достаточно высокое генетическое разнообразие в популяциях *G. monophylla* обеспечивается и поддерживается за счет таких биологических особенностей вида, как перекрестноопыляемость и длительный репродуктивный период. *G. monophylla* – преимущественно перекрестноопыляемый вид. Такие виды, как правило, имеют значительно более высокие уровни генетического разнообразия, чем самоопыляемые (Hamrick, Godt, 1996; Nybom, 2004). Для *G. monophylla* характерна большая продолжительность жизни в сочетании с длительным генеративным периодом. Так, общая продолжительность жизни растений этого вида достигает 80 лет, при этом генеративный период может длиться около 60 лет (Селютин и др., 2008). По мнению Н. Nybom (2004), при сокращении численности популяций долгоживущих видов эти виды могут поддерживать более высокий уровень генетического полиморфизма, чем короткоживущие. Твердосемянность, присущая семенам *G. monophylla* и характерная для всех представителей семейства Fabaceae, позволяет семенам длительное время сохраняться в почве и массово прорастать при наступлении благоприятных условий. Это ведет к увеличению численности популяции

и повышению уровня генетического полиморфизма.

Филогеографические исследования показывают, что реликтовые популяции, сохранившиеся в рефугиумах, как правило, имеют более высокое генетическое и/или гаплотипное разнообразие, чем те, которые повторно заселили местообитания (Lumaret et al., 2002; Petit et al., 2003; Schonswetter et al., 2005). *G. monophylla* – реликтовый вид (Пяк, 2003), что также может служить предпосылкой достаточно высокого уровня его генетической изменчивости.

Для оценки уровня межпопуляционной изменчивости белковых спектров использовали дистанцию М. Nei (1972). Между популяциями дистанция Nei варьирует от 0.018 до 0.215; по белковым спектрам наибольшая дистанция (0.215) выявлена между популяциями Инегень и Малая Иня (табл. 2). Популяция Инегень наиболее географически и генетически изолирована от других изученных нами популяций; дистанция Nei между данной популяцией и всеми остальными популяциями варьирует от 0.113 до 0.215.

Наибольшее сходство по белковым спектрам обнаружено между популяциями Сальджар и Большой Ильгумень (0.018). Популяция Большой Яломан имеет значительное сходство с популяциями Сальджар (0.054) и Малая Иня (0.064). Высокие значения коэффициента идентичности указывают на близкое генетическое родство данных популяций.

Анализ главных координат (Principal Coordinates Analysis – PCoA) показал, что полипептидные спектры растений большинства изученных популяций в значительной степени

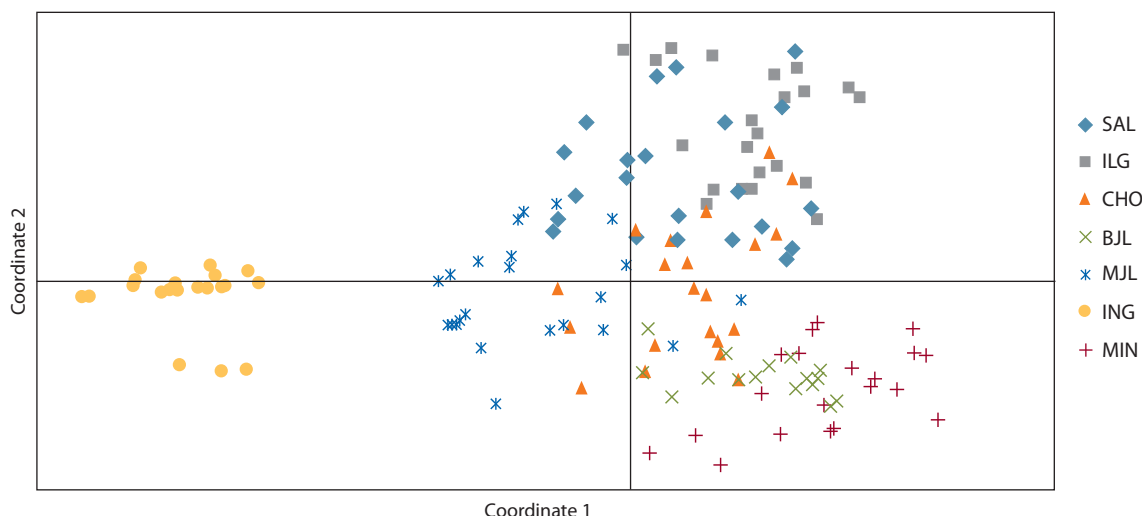


Fig. 2. Analysis of genetic heterogeneity in seven *G. monophylla* populations in a principal coordinate model.

ни близки (рис. 2). Отдельную группу формируют особи популяции Инегень, что подтверждает их генетическую обособленность.

В ходе анализа матриц методом главных координат было установлено, что первая и вторая главные координаты описывают 21.4 и 34.7 % изменчивости соответственно. На ГК1 приходится 21.4 % изменчивости, на ГК2 – 34.7 %.

С помощью анализа молекулярной дисперсии AMOVA выявлено, что на долю внутрипопуляционной изменчивости приходится 53 %, межпопуляционной – 47 %.

На основе расчета генетической дистанции и идентичности Nei выявлена невысокая дифференциация между большинством изученных популяций *G. monophylla* (за исключением популяции Инегень) по сравнению с рядом других редких видов. Так, для редкого вида *Astragalus crassicastrum* var. *trichocalus* генетическая дистанция составила 0.429–0.715 (Rogenski et al., 2009), для редкого эндемичного вида *Astragalus nitidiflorus* дифференциация между популяциями равна 0.279 (Vicente et al., 2011), у редких видов *Astragalus olchonensis* Gontsch. и *Astragalus sericeocanus* Gontsch. выявлен коэффициент сходства между популяциями 67.7 и 56.0 (Дорогина и др., 2012). Полученные нами результаты согласуются с данными, выявленными для других видов: у редкого вида *Hedysarum theinum* Krasnob. генетическая дистанция между популяциями составила 0.085–0.182 (Звягина, Дорогина, 2013); у эндемичного вида *Rheum tanguticum* межпопуляционная дистанция 0.062–0.183. Одной из причин выявленной изменчивости между популяциями *G. monophylla* может служить ее обитание в экологически однородной среде. Известно, что невысокая генетическая подразделенность популяций может быть обусловлена однородностью экологических условий обитания вида (Karron et al., 1988).

Результаты нашего исследования подтверждают ранее опубликованные данные о том, что некоторые редкие виды способны поддерживать высокое генетическое разнообразие даже при небольшом размере популяций. Полученные данные позволяют разработать стратегию охраны *G. monophylla* в естественных местах обитания,

а также послужат основой для сохранения вида *ex situ*, создания банка семян и реинтродукции гульденштедтии однолистной. В настоящее время в популяциях *G. monophylla* отмечен достаточно высокий уровень генетического разнообразия, следовательно, основные причины, угрожающие выживанию вида, носят характер внешних воздействий. Основным фактором, который ставит под угрозу благополучное существование популяций *G. monophylla*, – полное или частичное разрушение местообитаний, подвергающихся в последнее время интенсивному выпасу и возрастающей рекреационной нагрузке.

С учетом узкой специализации и наличия немногочисленных популяций в пределах дизъюнктивного ареала основные меры по охране этого вида должны быть направлены на поддержание эффективного размера популяций и защиту его естественных мест обитания.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Agafonov A.V., Agafonova O.V. SDS-electrophoresis of endosperm proteins from *Elymus* species differing in genomic structure. *Sibirskii Biologicheskii Zhurnal* = Siberian J. Biol. 1992;3:7-12. (in Russian)
- Chen L., Chen F., He S., Ma L. High genetic diversity and small genetic variation among populations of *Magnolia wufengensis* (Magnoliaceae), revealed by ISSR and SRAP markers. *Electronic J. Biotechnol.* 2014;17:268-274. DOI 10.1016/j.ejbt.2014.08.003.
- Ci X.Q., Chen J.Q., Li Q.M., Li J. AFLP and ISSR analysis reveals high genetic variation and inter-population differentiation in fragmented populations of the endangered *Litsea szemaois* (Lauraceae) from Southwest China. *Plant Syst. Evol.* 2008;273:237-246.
- Dorogina O.V., Zhmud E.V., Zvyagina N.S. Electrophoretic spectrum variability and specificity of seed storage proteins from *Astragalus* species (Fabaceae). *Turczaninowia.* 2012;15(4):52-57. (in Russian)
- Frankham R. Genetics and conservation biology. *Comptes Rendus Biologies.* 2003;326:22-29.
- Frankham R. Stress and adaptation in conservation genetics. *J. Evol. Biol.* 2005;18:750-755.
- Frankham R., Ballou J.D., Brosco D.A. Introduction to Conservation

- Genetics. Cambridge: Cambr. Univ. Press, 2002.
- Gitzendanner M.A., Soltis P.S. Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. *Am. J. Bot.* 2000;87(6):783-792.
- Gordon S.P., Sloop C.M., Davis H.G., Cushman J.H. Population genetic diversity and structure of two rare vernal pool grasses in central California. *Conserv. Genet.* 2012;13:117-130.
- Hamrick J.L., Godt M.J.W. Allozyme diversity in plant species. *Plant Population Genetics, Breeding and Germplasm Resources*. Eds. A.H.D. Brown, M.T. Clegg, A.L. Kahler, B.S. Weir. Sunderland: Sinauer Press, 1990.
- Hamrick J.L., Godt M.J.W. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philos. Trans. Roy. Soc. Lond. B.* 1996;351: 1291-1298. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.1996.0112>.
- Kalijund K., Jaaska V. No loss of genetic diversity in small and isolated populations of *Medicago sativa* subsp. *falcate*. *Biochem. System. Ecol.* 2010;38:510-520.
- Karron J.D., Linhart Y.B., Chaulk C.A., Robertson C.A. Genetic structure of populations of geographically restricted and widespread species of *Astragalus* (Fabaceae). *Am. J. Bot.* 1988;75(8):1114-1119.
- Krasnaya kniga Respubliki Altai [The Red Book of the Altai Republic]. Novosibirsk, 1996. (in Russian)
- Krasnaya kniga Respubliki Tyva [The Red Book of the Republic of Tyva]. Rasteniya [Plants]. Novosibirsk, 2002. (in Russian)
- Krasnaya kniga Rossiyskoy Federatsii. [The Red Book of the Russian Federation]. Rasteniya i griby [Plants and Fungi]. Moscow, 2008. (in Russian)
- Lande R. Risks of population extinction from demographic and environmental stochasticity and random catastrophes. *Amer. Naturalist.* 1993;142:911-927.
- Leammli U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-685.
- Li Y.Y., Guan S.M., Yang S.Z., Luo Y., Chen X.Y. Genetic decline and inbreeding depression in an extremely rare tree. *Conserv. Genet.* 2012;13:343-347.
- Lopes M.S., Mendonc D., Bettencourt S.X., Borba A.R., Melo C., Baptista C., da Camara Machado A. Genetic diversity of an Azorean endemic and endangered plant species inferred from inter-simple sequence repeat markers. *AoB Plants.* 2014;6:1-15. DOI 10.1093/aobpla/plu034.
- Lumaret R., Mir C., Michaud H., Raynal V. Phylogeographical variation of chloroplast DNA in holm oak (*Quercus ilex* L.). *Mol. Ecol.* 2002;11:2327-2336.
- Masayuki M. Population genetics of threatened wild plants in Japan. *J. Pl. Res.* 2003;116:169-174.
- Mongolian Red Book. Ed. Ts. Shirevdamba. Ulaanbaatar: Admon Print Press, 2013.
- Namzalov B.B. Gyl'denshtedtiya odnolistnaya – *Gueldenstaedtia monophylla* Fisch. [*Gueldenstaedtia monophylla* Fisch.]. Biologicheskie osobennosti rasteniy Sibiri, nuzhdayushchikhsya v okhrane [Biological features of Siberian plants in need of protection]. Novosibirsk, 1986. (in Russian)
- Nei M. Genetic distance between populations. *Amer. Naturalist.* 1972; 106(949):283-292. <http://dx.doi.org/10.1086/282771>.
- Nei M., Li W.H. Mathematical models for studying genetic variation in terms of endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1979;76:5269-5273.
- Nybom H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Mol. Ecol.* 2004;13:1143-1155. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02141.x>.
- Peakall R., Smouse P.E. GenALEX 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics.* 2012;28:2537-2539.
- Petit R.J., Aguinalalde I., de Beaulieu J.L., Bittkau C., Brewer S., Cheddadi R., Ennos R., Fineschi S., Grivet D., Lascoux M., Mohanty A., Muller-Starck G.M., Demesure-Musch B., Palme A., Martin J.P., Rendell S., Vendramin G.G. Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science.* 2003;300:1563-1565.
- Primak R.B. Osnovy sokhraneniya bioraznoobraziya [Basics of Biodiversity Protection]. Moscow, 2002. (in Russian)
- Pyak A.I. Petrofity Russkogo Altaya [Petrophytes in Russian Altai]. Tomsk, 2003. (in Russian)
- Redkie i ischezayushchie rasteniya Sibiri [Rare and Endangered Plants of Siberia]. Novosibirsk, 1980. (in Russian)
- Rogenski C., Smith M., Esselman E. ISSR marker diversity of the threatened *Astragalus crassicastrum* var. *trichocalyx* in Illinois populations. *Trans. Illinois St. Acad. Sci.* 2009;102(3/4):149.
- Rossetto M., Weaver P.K., Dixon K.W. Use of RAPD analysis in devising conservation strategies for the rare and endangered *Grevillea scapigera* (Proteaceae). *Mol. Ecol.* 1995;4:357-364.
- Schonswetter P., Stehlik I., Holderegger R., Tribsch A. Molecular evidence for glacial refugia of mountain plants in the Europe Alps. *Mol. Ecol.* 2005;14:3547-3555.
- Selyutina I.Yu., Cherkasova E.S., Karnaukhova N.A. The structure of coenopopulations of a rare species *Gueldenstaedtia monophylla* (Fabaceae) in the Central Altai. *Botanical Journal.* 2008;9(93):1414-1423. (in Russian)
- Vicente M.J., Segura F., Aguado M., Migliaro D., Franco J.J., Martinez-Sanchez J.J. Genetic diversity of *Astragalus nitidiflorus*, a critically endangered endemic of SE Spain, and implications for its conservation. *Biochem. Syst. Ecol.* 2011;39:175-182.
- Willi Y., Van Buskirk J., Hoffmann A.A. Limits to the adaptive potential of small populations. *Ann. Rev. Ecol. Evol. System.* 2006;37:433-458.
- Wu F.Q., Shen S.K., Zhang X.J., Wang Y.H., Sun W.B. Genetic diversity and population structure of an extremely endangered species: the world's largest *Rhododendron*. *AoB Plants.* 2014. DOI 10.1093/aobpla/plu082.
- Yeh F.C., Yang R., Boyle T. POPGENE: Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis. Release 1.31. 1999. available at <http://www.ualberta.ca/~fyeh/index.htm>.
- Zhao X.F., Ma Y.P., Sun W.B., Wen X., Milne R. High genetic diversity and low differentiation of *Michelia coriacea* (Magnoliaceae), a critically endangered endemic in southeast Yunnan, China. *Int. J. Mol. Sci.* 2012;13:4396-4411.
- Zhu H. A tropical seasonal rain forest at its altitudinal and latitudinal limits in southern Yunnan, SW China. *Gard. Bull. Singap.* 2004;56: 55-72.
- Zhuravlev Y.N., Koren' O.G., Muzarok T.I., Reunova G.D., Kozyrenko M.M., Artyukova E.V., Ilyushko M.V. Molecular markers for the preservation of rare plant species of the Far East. *Fiziologiya rasteniy = Vegetable Physiol.* 1999;46(6):953-964. (in Russian)
- Zvyagina N.S., Dorogina O.V. Genetic differentiation of the Altai-Sayan endemic *Hedysarum theinum* Krasnob. (Fabaceae) evaluated by inter-simple sequence repeat analysis genetics. *Russ. J. Genetics (Moscow).* 2013;49(10):1030-1035.

Differentiation between some *Ulva* spp. by morphological, genetic and biochemical analyses

M.M. Ismail¹ , S.E. Mohamed²

¹ Marine Environmental Division, National Institute of Oceanography and Fisheries, Alexandria, Egypt

² Department of Molecular Biology, Genetic Engineering and Biotechnology Research Institute, Sadat City University, Sadat City, Egypt

Ulva is most common green seaweed in Egypt coast, it used as a source of food, feed, medicines and fertilizers in all the world. This study is the first time to investigate the morphological, genetic and biochemical variation within four *Ulva* species collected from Eastern Harbor, Alexandria. The morphology description of thallus showed highly variations according to species, but there is not enough data to make differentiation between species in the same genus since it is impacted with environmental factors and development stage of seaweeds. Genetic variations between the tested *Ulva* spp. were analyzed using random amplified polymorphic DNA (RAPD) analyses which shows that it would be possible to establish a unique fingerprint for individual seaweeds based on the combined results generated from a small collection of primers. The dendrogram showed that the most closely species are *U. lactuca* and *U. compressa*, while, *U. fasciata* was far from both *U. lactuca* and *U. compressa*. Meanwhile, *U. linzea* is showed to be a unique species. The biochemical composition (e.g. protein, carbohydrate, lipid and pigment composition) of the collected *Ulva* spp. grouped the collected *Ulva* spp. into two groups (*U. fasciata* and *U. lactuca*) and other (*U. compressa* and *U. linzea*).

Key words: morphological character; genetic; biochemical; RAPD; *Ulva* spp.

Различия между некоторыми видами рода *Ulva*, выявленные путем морфологического, генетического и биохимического анализа

М.М. Исмаил¹ , С.Э. Мохамед²

¹ Отдел исследований морской среды Национального института океанографии и рыболовства, Александрия, Египет

² Отдел молекулярной биологии Исследовательского института генной инженерии и биотехнологий, Садатский университет, Садат, Египет

Ульва – самая распространенная зеленая водоросль, обитающая у побережья Египта. Во всем мире она используется в качестве продукта питания, применяется в медицинских целях, а также идет на удобрения и фураж. В статье приводятся результаты первого исследования морфологических, генетических и биохимических различий между четырьмя видами водорослей рода *Ulva*, образцы которых были собраны в Восточной бухте города Александрии (Египет). При исследовании морфологии таллуса были выявлены значительные видоспецифические различия, но данных для того, чтобы отделить один вид от другого в пределах одного и того же рода, недостаточно, поскольку на указанный признак влияют как экологические факторы, так и стадия развития растения. Генетические различия между исследованными видами ульвы анализировали с помощью метода случайно амплифицируемой полиморфной ДНК (RAPD). Анализ дендрограммы показал, что наиболее близки друг к другу виды *U. lactuca* и *U. compressa*, тогда как *U. fasciata* является видом, отдаленным как от *U. lactuca*, так и от *U. compressa*. В то же время было показано, что *U. linzea* является уникальным видом. Различия, выявленные между видами ульвы методом RAPD, говорят о возможности получения «фингерпринта» для индивидуальных водорослей при использовании лишь небольшого числа праймеров. На основе своего биохимического состава (белкового, углеводного, липидного и пигментного) собранные виды были разбиты на две группы: в одну вошли *U. fasciata* и *U. lactuca*, а в другую – *U. compressa* и *U. linzea*.

Ключевые слова: морфологический признак; генетический; биохимический; RAPD; ульва.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Исмаил М.М., Мохамед С.Э. Различия между некоторыми видами рода *Ulva*, выявленные путем морфологического, генетического и биохимического анализа. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(3):360-367. DOI 10.18699/VJ17.253

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Ismail M.M., Mohamed S.E. Differentiation between some *Ulva* spp. by morphological, genetic and biochemical analyses. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(3):360-367. DOI 10.18699/VJ17.253

The green algal genus *Ulva* commonly known as sea lettuce, including species previously placed in the genus *Enteromorpha* (monostromatic tubular thalli) (Hayden et al., 2003), is well known for its wide distribution in marine, freshwater and brackish environments on a global scale in the intertidal and shallow subtidal zones of rocky shores all over the world (Reed, Russell, 1979; van den Hoek et al., 1995; Shimada et al., 2007, 2008; Ichihara et al., 2009). The genus *Ulva* was first identified by Linnaeus in 1753 (Kong et al., 2011). Since many taxonomists and phycologists have been involved in the identification of *Ulva* species (Wolf et al., 2012) which are notoriously difficult to classify due to the morphological plasticity expressed by many members as well as the few reliable characters available for differentiating taxa (Heech et al., 2009; Wolf et al., 2012). It is morphology heavily influenced by environmental conditions, age of the thallus, and life style, making difficult the delineation of species by morphological features alone (Wolf et al., 2012).

Until 2003, leafy forms and tubular forms were generally attributed to two separate genera, *Ulva* and *Enteromorpha*, respectively. However, intermediate forms between *Ulva* and *Enteromorpha* had been observed in some circumstances and there was evidence that under certain environmental conditions some species could switch from a morphotype to the other (Tan et al., 1999). Bliding (1968) recognized eight *Ulva* species in Europe and used mainly microscopic characters: cell size and shape in the blade and basal area (both in surface view and in section), thallus thickness, cell arrangement, chloroplast position and number of pyrenoids. Several authors have questioned the validity of morphological characteristics for identification purposes, because of the large variation observed between individuals at different sites and between individuals at the same site in different seasons (Mshigeni, Kajamulo, 1979; Tanner, 1986). Seaweeds have an interesting chemical composition that makes their commercial exploitation attractive to produce functional or health promoting food. *Ulva* is a good source for food, development of novel drugs and functional foods, pharmaceutical and agricultural applications (Costa et al., 2010; Wijesekara et al., 2011).

Recent studies based on molecular data carried out in different parts of the world invariably have shown a higher species diversity than suggested by morphology, revealing cryptic species and introduced taxa not previously detected (Loughnane et al., 2008; O'Kelly et al., 2010). The molecular data produced in the last 10 years have led to a much better characterization of species concepts and circumscriptions (Hayden et al., 2003). Recent improvements in DNA extraction procedures have made it possible to obtain partial sequences from type specimens, and in some cases this has led to unexpected results. For example, it has been shown that the molecular identity of the type specimen of *U. lactuca* does not match that of specimens that have since been assigned to this name, and corresponds to the entity named *U. fasciata* (O'Kelly et al., 2010).

Genetic variation between *Ulva* species are assessed by the presence or absence of each product. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) technique based on the Polymerase Chain Reaction (PCR) has been one of the most commonly used molecular techniques to develop DNA markers (Bardakci, 2001). Polymorphisms can occur due to base

substitutions at the primer binding sites or to differences in the regions between the sites. RAPD markers have been used for species identification, analysis of population structure, analysis of genetic impacts of environmental stress and analysis of genetic diversity (Williams et al., 1993).

The aim of the present study was to provide information on the morphology, genetic and biochemical characters of most common *Ulva* spp. in Eastern Harbor of Alexandria.

Materials and methods

Collection and identification of *Ulva* species. Four species of *Ulva* were handpicked collected in spring 2014 at depth of 0.2 m or less from rocky of Eastern Harbor water, Alexandria (longitudes 29°53'–29°54' E and latitudes 31°12'–31°13' N) which are excellent domains for seaweed attachment (Fig. 1). All samples were brought to the laboratory in plastic bags containing seawater to prevent evaporation. In laboratory, seaweeds were cleaned from epiphytes and rock debris and given a quick fresh water rinse to remove surface salts. On the same of collection, some of fresh samples were processed as herbarium specimens and deposited in the Taxonomy Museum Marine Environmental Division (National Institute of Oceanography and Fisheries, Kayet Bay, Alexandria, 21556, Egypt); other of them were preserved in 5 % formalin seawater for morphology study and the other cleaned seaweeds were then air dried in the shade at room temperature (25–30 °C) on absorbent paper for estimation of moisture content. Then, they were pulverized in a cereal grinder for 5 min and sieved, using a 100 mesh sieve, to obtain a fine and homogeneous powder that was stored in hermetic sealed plastic bags and stored at –20 °C until for genetic and biochemical analysis. All seaweeds were identified taxonomically following the methods of Taylor (1960), Abbott and Hollenberg (1976), Aleem (1993), Jha et al. (2009). The names of the species were used according to Guiry, Guiry (2011) and were confirmed using algaebase website.

Morphological studies. Macroscopic observations on the algae included the thallus colour, length, texture and, if attached morphotypes were found, the holdfast was screened. The following microscopic characteristics were recorded: cell sizes of at least ten randomly chosen cells, thallus thickness, shape and arrangement of the cells in surface view, shape and arrangement of the chloroplast in surface view (cap-like appearance or not) and number and distribution of pyrenoids.

Genetic studies. DNA extraction. About 500 mg of the freeze algae (–20 °C) was ground in a pre-cooled mortar and pestle by adding liquid nitrogen. DNA was isolated from samples by CTAB method (Doyle, Doyle, 1987).

RAPD-PCR. Amplification of genomic DNA was performed in 25 µl reaction mixture containing 9.5 µl water, 0.5 µl of RAPD primer, 12.5 µl PCR master mix and 2.5 µl DNA. RAPD-PCR was performed by 14 different RAPD primers (Tab. 1) after checking the DNAs by agarose gel electrophoresis. PCR bands were checked again by agarose gel electrophoresis after PCR analysis. Amplification done with 5 cycles; denaturation at 94 °C for 1 minute, annealing at 40 °C for 30 seconds and extension at 72 °C for 1 minute, 40 cycles; denaturation at 94 °C for 45 seconds, annealing at 60 °C for 1 minute and extension at 72 °C for 45 seconds, final extension at 72 °C for 11 minutes. The amplified prod-



Fig. 1. Location of collected seaweeds.

uct kept in 4 °C until gel electrophoresis. 12 µl of each PCR product was electrophoresed on 1.2 % agarose gel in TAE buffer (40 mM Tris acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0) at 80 V for 1 hour. The gel was stained with ethidium bromide and photographed.

Biochemical studies. Biochemical studies including ash content which was estimated by ashing the ground dried samples overnight in a muffle furnace at 525 °C, the protein fraction (% of DW) was calculated from the elemental N determination using the nitrogen-protein conversion factor of 6.25 according to AOAC (1995), total carbohydrate was estimated by following the phenol-sulphuric acid method of Dubois et al. (1956), using glucose as standard, lipids were extracted with a chloroform-methanol mixture (2:1 v/v) then were dried over anhydrous sodium sulphate, after which the solvent was removed by heating at 80 °C under vacuum (AOAC, 2000) and the pigment contents e. g. chlorophyll *a* and *b* were extracted in 90 % acetone, estimated spectrophotometrically according to the method of Jeffrey, Humphrey (1975) and carotenoids were estimated in the same extract of chlorophyll at 480 nm by Ridley method (1977).

Statistical analysis. Results are expressed as mean± standard deviation (SD) from three replicates. Data obtained were analyzed statistically using SAS (6.12) to determine the degree of significance using one way analysis of variance (ANOVA) at probability level $p \leq 0.05$, followed by the Community Analysis Package (CAP) 4.0. The relationships between the *Ulva* spp. were determined by cluster analysis (Richard, Peter, 2007).

Results and discussion

Morphological and taxonomical description of *Ulva* species

Algal collection were identified as presented in the literatures, checked for synonyms and latest accepted names, referred to its systematic groups and described. The collected species were identified as *Ulva compressa*, *U. fasciata*, *U. lactuca* and *U. linzea* (Phylum: Chlorophyta; Class: Chlorophyceae; Order: Ulvales; Family: Ulvaceae). There was significant variation in morphological characteristics of *Ulva* spp.

Table1. The sequence of the RAPD primers used in the study

Primer number	Nucleotide sequence (5'– 3')
1	TGCCGAGCTG
2	AATCGGGCTG
3	TCTGTGCTGG
4	TTCCGAACCC
5	CAGGCCCTTC
6	GGTCCCTGAC
7	TCGGCGATAG
8	CAGCACCCAC
9	CAAACGTCGG
10	GTTGCGATCC
11 (OPB-10)	CTGCTGGGAC
12 (OPB-12)	CCTTGACGCA
13 (OPC-07)	GTCCCGACGA
14 (OPW-03)	GTCCGGAGTG

Genus (1): *Ulva compressa* (Linnaeus) Grev

Synonyms: *Enteromorpha compressa* (Linnaeus) Nees, *E. intestinalis* (L.) Nees, subsp. *compressa* De Silva and Burrows.

Morphological description: Thalli green color, up to 20 cm, 1–2.5 mm broad membranaceous, flat, narrow bladed form, tapering upward, waving margin, branching at the base, attached at first by a short cylindrical stipe (Fig. 2, *a*).

Surface view: Surface cells minute, polygonal, irregular arrangement, cell contents chloroplast with pyrenoids 1–2 per cell (Fig. 2, *b*).

Remarks: It is present in peaches and act as habitats for different polychaetes sp.

Genus (2): *Ulva fasciata* Delile

Synonyms: *Ulva lactuca* f. *fasciata* (Delile) Hering, *Phycoseris fasciata* (Delile) Montagne.

Morphological description: Thallus yellow to dark green in colour, thin, up to 40 cm long, 8–12 cm wide at base, tapering upward to less than 1.5 cm wide at tip and deeply divided into a number of lobes, 1–3 cm broad lobes; sheet like, blades irregularly linear with slightly irregular margins with occasional coarse microscopic marginal teeth or spine projections (Fig. 3, *a*).

Surface view: Cells in surface view polygonal, palisade like with two cells thick and irregularly arranged. Cells uninucleate, chloroplast plate-like filling outer part of cell and having two pyrenoids (Fig. 3, *b*).

Remarks: It is the most common species in collected season and place. It is good habitats for polychaetes and zooplankton spp.

Genus (3): *U. lactuca* Linnaeus

Synonyms: *U. lactuca efolia* Gray, *U. fenestrata* Postels and Ruprecht, *U. stipitata* Areschoug, *U. crassa* Kjellman.

Morphological description: Thalli bright green, much broader (15–20 cm) than long (10–15), flat, rounded, foliose, leafy, soft, broad, membranous with undulated margins and

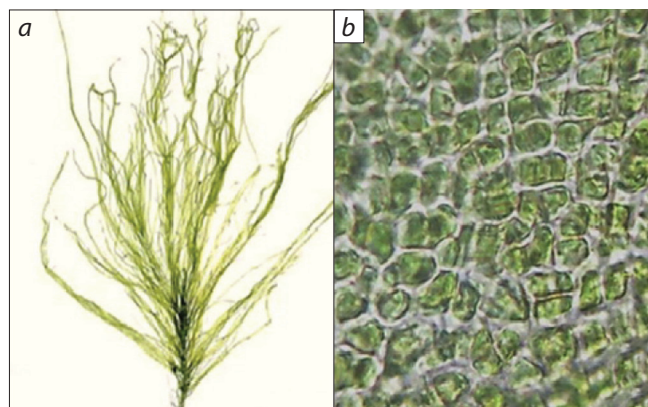


Fig. 2. (a) *U. compressa* and (b) surface view of cells of blade.

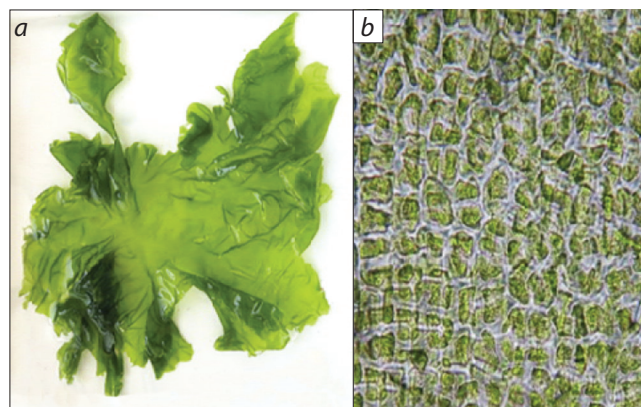


Fig. 4. (a) *U. lactuca* and (b) surface view of cells of blade.

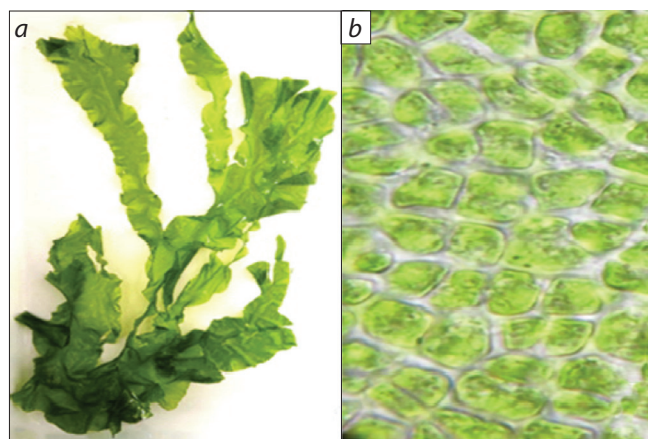


Fig. 3. (a) *U. fasciata* and (b) surface view of cells of blade.

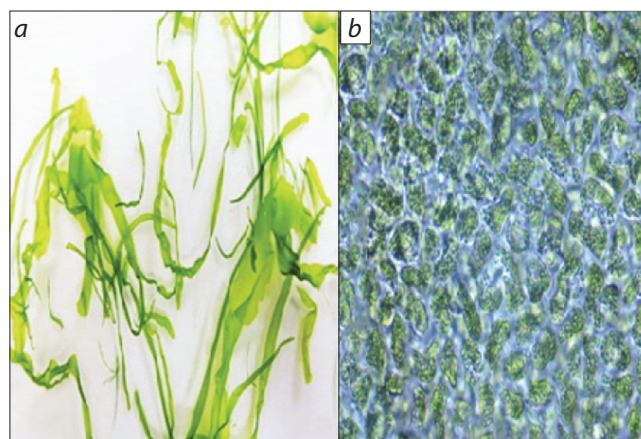


Fig. 5. (a) *U. linzea* and (b) surface view of cells of blade.

normally wider at the top than at the base resembling a lettuce leaf (Fig. 4, a).

Surface view: Under microscope examination; surface cells have various shapes and sizes with no regular arrangement with rounded angles, chloroplast usually fills the outer end of the cell with one or more pyrenoids. Transverse section of frond shows the two layers of cells (Fig. 4, b).

Remark: The natural blades of *U. lactuca* and *U. fasciata* were more rigid than other tested *Ulva* spp. This characteristic was attributed to the number of strata of cells in transversal section.

Genus (4): *Ulva linzea* Linnaeus

Synonyms: *Enteromorpha linza* (Linnaeus) J. Agardh, *U. procera* (K. Ahlner) Hayden.

Morphological description: Thalli green in color, compressed, linear lanceolate, unbranched, flattened, up to 30 cm long and less than 1.0 cm broad in basal part which are tapered from the base towards the apex to become spine like, with wave margin (Fig. 5, a).

Surface view: Microscope examination showed that the cells in surface view generally polygonal without regular arrangement, interspace between cell is wide and no hollow parts in blades. Cell is taller than broad, uninucleate, chloroplast with the large number of pyrenoids (Fig. 5, b).

As shown from previously morphological examination, there are significantly different in macroscopic description.

On the other hand, there are some similarity in microscopic examination so these methods are not suitable for differentiation between *Ulva* spp. There are little data related to our study, the morphological and anatomical structure (thickness of marginal, mid, and basal regions; cell height in transverse section and cell size in surface section) of *U. rigida* significantly affected by thallus age (Phillips, 1988), seasons and locations (Dural, Demir, 2001). Cell size is known to vary under different environmental conditions such as salinity (Koeman, van den Hoek, 1981), temperature and light availability (Israel et al., 1995) and for these reasons does not seem to be a good characteristic for identification. Pyrenoid number and distribution useful for identification (Koeman, van den Hoek, 1981) but the pyrenoids can be very hard or even impossible to observe if the cells contain many starch grains (Malta et al., 1999). Pettett (2009) stated that the ability of *Ulva* to switch morphological characteristics under different environmental conditions makes *Ulva* taxonomy difficult so it should be used more advanced methods like genetic information. Genetic information reassigned the genus *Enteromorpha* to the genus *Ulva* (Hayden et al., 2003).

Genetic variation

Data in Table 2 showed a total of amplified fragments 31, 38, 38 and 31 over all the 14 random primers using the ran-

Table 2. Amplified, absent, polymorphic and common bands over all random primers *Ulva* species

Species	No of amplified bands	No of absent bands	No of polymorphic bands	% of common bands	% of polymorphic bands
<i>U. compressa</i>	38	13	28	26.32	73.68
<i>U. fasciata</i>	31	20	21	32.25	67.74
<i>U. lactuca</i>	38	13	28	26.32	73.68
<i>U. linzea</i>	31	20	21	32.25	67.74

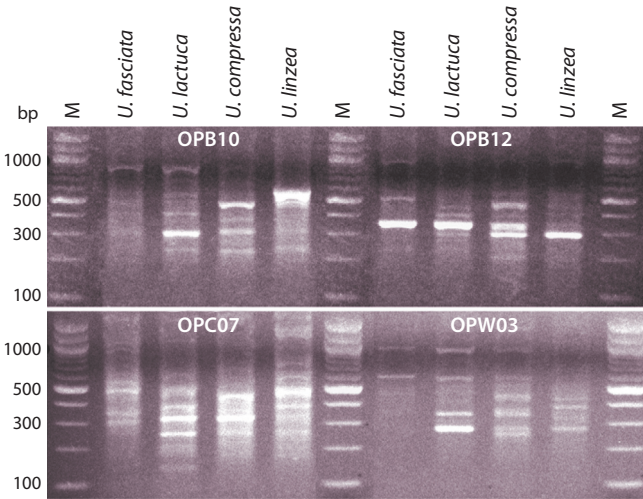


Fig. 6. RAPD polymorphism in four *Ulva* species.
Primer No. 11 (5'-CTGCTGGGAC), Primer No. 12 (5'-CCTTGACGCA),
Primer No. 13 (5'-GTCCCGACGA) and Primer No. 14 (5'-GTCCGGAGTG).

dom amplified polymorphic DNA technique for *U. fasciata*, *U. lactuca*, *U. compressa* and *U. linzea*, respectively. The ratio of the common fragments was 32.25 % for each of *U. fasciata* and *U. linzea* and 26.32 % for each of *U. lactuca* and *U. compressa*.

It is worthy to mention that each of the genomic DNA of *U. lactuca* and *U. compressa* had thirty-eight (38) amplified fragments over all used primers of them twenty-eight (28) polymorphic fragments with a ratio of 73.68 % for each of the two species.

Meanwhile, each of the genomic DNA of *U. fasciata* and *U. linzea* had thirty-one (31) amplified fragments as present bands of them twenty-one (21) polymorphic fragments with a ratio of 67.74 % for each of the two species.

Data in Table 3, revealed that the genetic similarity between *U. lactuca* and *U. compressa* had the score of 0.79, meanwhile it had the score of 0.55 between *U. fasciata* and *U. linzea*. These results clearly indicated that the species *U. lactuca* is the closest one to species *U. compressa* and the species *U. linzea* was the most divergent from species *U. fasciata*. Moreover, the phylogenetic relationship indicated by the dendrogram in Fig. 6 and confirmed the aforementioned results obtained from Table 3.

The dendrogram (Fig. 7) showed that the most closely species are *U. lactuca* and *U. compressa* (Guidone et al., 2013). However, *U. fasciata* (Pasad et al., 2009) is showed to be far from both *U. lactuca* and *U. compressa*. Meanwhile, *U. linzea*

showed to be a unique species, suggesting that it is quite different than the other three species at the level of RAPD-PCR primers used in this study. Moreover, these clustering dendrogram suggests that using more primers could be beneficial to confirm these results.

Biochemical characteristics of *Ulva* spp.

The biochemical composition (moisture content, ash, protein, carbohydrate and lipid) of *Ulva* spp. is illustrated in Table 4. No significant differences were noticed in moisture content in all tested *Ulva* spp. which ranged between 82.142 to 85.545 % DW. Our results are in agreement with Moustafa and Saeed (2014) who stated that the moisture content of macroalgae within the range 83.67–86.98 % DW.

Ash value was highest in *U. fasciata* (22.987 % DW) followed by *U. lactuca* (21.345 % DW) then *U. linzea* (20.897 % DW) and *U. compressa* (20.135 % DW). The present study showed no significant differences in the ash content between *Ulva* spp. and ranged between 20.135 to 22.987 % DW. Our results are consistent with the observations reported by Wong and Cheung (2001) who stated that the ash content of *U. lactuca* range between 21.3–24.6 % DW and 25.4 % DW for *U. fasciata* (McDermid, Stuercke, 2003). Khairy, El-Shafay (2013) recorded that the ash content of *U. lactuca* which range between 17.6–23.4 % DW in spring which the same season of collected samples.

The protein content of *Ulva* spp. had significant difference among *Ulva* species. The protein content of *U. compressa* (22.056 % DW) was higher than other species while the protein content of *U. fasciata* (13.091 % DW) was the lowest one. This observation is similar to that observed Dhargalkar et al. (1980) who detected that protein content varied among different genera and also in different species of the same genus, Fleurence (1999) reported that the protein content of *Ulva* spp. range of 10–26 %, and Kokilam, Vasuki (2014) stated that *Ulva* sp. had protein content within the range of 10–20 % (DW).

The level of carbohydrate was very high compared to protein and lipid. There are significant variations in carbohydrate between *Ulva* species. The carbohydrate content of *U. fasciata* was richer than other *Ulva* spp. (46.670 % DW), while the lowest carbohydrate content was recorded in *U. linzea* (33.221 % DW). These results were in conformity with Khairy and El-Shafay (2013) who recorded that the carbohydrate content of *U. lactuca* ranged from 42.1 to 46.5 % DW and Moustafa and Saeed (2014) detected that the carbohydrate content in *Ulva* sp. ranged between 49.21 to 51.37 % DW in spring.

In comparison to protein and carbohydrate, lipid exhibited no significant different and low proportion in *Ulva* spp. The

Table 3. Genetic similarity matrix among four *Ulva* spp. based on polymorphic RAPD band

Species	<i>U. compressa</i>	<i>U. fasciata</i>	<i>U. lactuca</i>	<i>U. linzea</i>
<i>U. compressa</i>	1	0.64	0.79	0.64
<i>U. fasciata</i>	0.64	1	0.67	0.55
<i>U. lactuca</i>	0.79	0.67	1	0.67
<i>U. linzea</i>	0.64	0.55	0.67	1

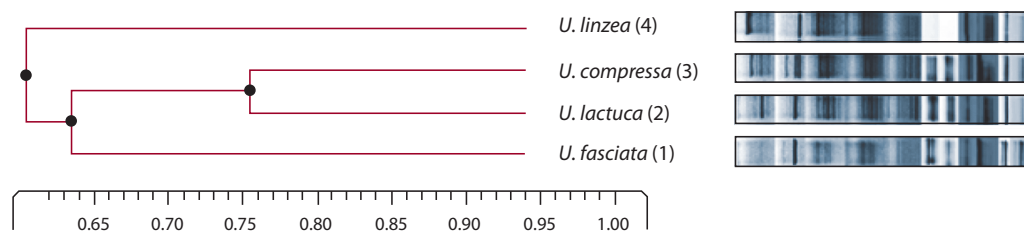


Fig. 7. RAPD cluster analysis of four *Ulva* species depending upon simple matching coefficient and using the UPGMA clustering method.

Table 4. The mean ($\pm$ SD) contents of moisture, ash, protein, carbohydrate and lipid (% dry weight) in the different *Ulva* spp.

% DW	Moisture	Ash	Protein	Carbohydrate	Lipid
<i>U. compressa</i>	83.027 $\pm$ 1.12	20.135 $\pm$ 0.21	22.056 $\pm$ 1.01	29.572 $\pm$ 2.22	2.646 $\pm$ 0.66
<i>U. fasciata</i>	83.358 $\pm$ 1.03	22.987 $\pm$ 0.89	13.091 $\pm$ 0.89	46.670 $\pm$ 2.25	4.395 $\pm$ 0.85
<i>U. lactuca</i>	85.545 $\pm$ 0.87	21.345 $\pm$ 0.71	16.416 $\pm$ 0.08	39.733 $\pm$ 1.23	3.875 $\pm$ 0.13
<i>U. linzea</i>	82.142 $\pm$ 0.65	20.897 $\pm$ 0.14	15.728 $\pm$ 0.45	33.221 $\pm$ 0.34	3.476 $\pm$ 0.03
F-value	128.774	131.252	803.971	48.981	10.168
P-value	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001

highest concentration of lipid was recorded in *U. fasciata* and the lowest concentration was observed in *U. compressa*. These results were in consistence with those of Dawes (1998) who stated that seaweeds exhibit low lipid contents. McDermid, Stuercke (2003) stated that the most macroalgae contained lipid less than 4 % DW.

As shown in Figure 8, the pigment contents were significantly different between *Ulva* spp. The highest chlorophyll *a* was registered in *U. linzea* (1.662 mg g⁻¹ FW) followed by *U. compressa* (1.522 mg g⁻¹ FW), then *U. fasciata* (1.154 mg g⁻¹ FW), and *U. lactuca* (0.667 mg g⁻¹ FW). Chlorophyll *b* was observed to be the richest *U. linzea* (1.090 mg g⁻¹ FW), while the lowest chlorophyll *b* was noted in *U. lactuca* (0.224 mg g⁻¹ FW). The greater total chlorophyll value was observed in *U. linzea* (2.792 mg g⁻¹ FW) followed by *U. compressa* (2.578 mg g⁻¹ FW). The minimum value was noted in *U. lactuca* (1.023 mg g⁻¹ FW). On the other hand, the maximum carotenoids was noted in *U. compressa* (0.507 mg g⁻¹ FW) followed by *U. linzea* (0.321 mg g⁻¹ FW). The lowest ratio was recorded in *U. lactuca* (0.24 mg g⁻¹ FW). Similar findings and trends were also reported by Dere et al. (2003) who detected that the pigment contents varied significantly with respect to the algal taxa, stations and depth. Moustafa, Saeed (2014) detected the total pigment of *Ulva* spp. ranged between 2.52–5.22 mg/g DW.

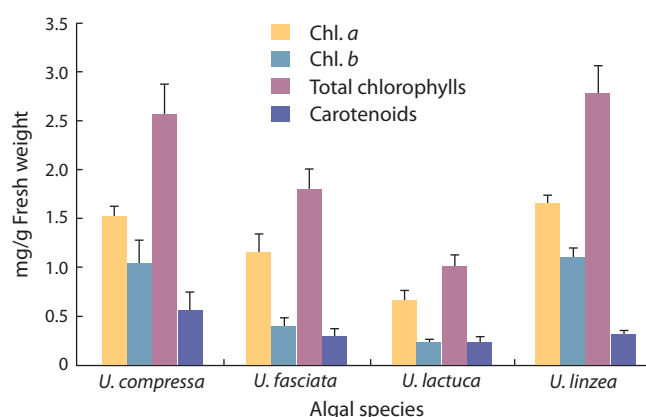


Fig. 8. Variation in photosynthetic content of the collected *Ulva* spp. (mg/g FW).

The reliable taxonomic identification of *Ulva* species is unlikely to be obtained on the basis of morphology alone (Malta et al., 1999). However, the traditional generic names represent a useful morphological distinction between the two-thallus types and, for the purposes of this research; the genera will be referred to as separate for the sake of clarity and continuity with previous authors.

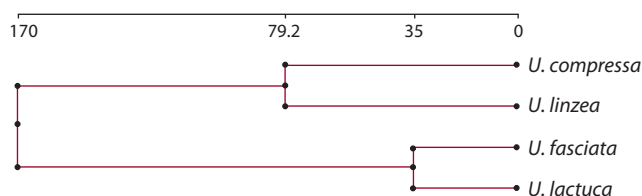


Fig. 9. The relationships of four *Ulva* species based on variation in biochemical composition expressed as Euclidean distance ward tree using CAP software.

The CAP program was used to measure the relationships between biochemical composition of *Ulva* spp. based on similarity estimates using ward tree building methods that indicate the species in this tree are divided into two major groups (*U. compressa* and *U. linzea*) and (*U. fasciata* and *U. lactuca*) which are closely related to each other (Fig. 9), respectively. Biochemical analysis of the collected *Ulva* spp. confirmed there are similarity between *U. lactuca* and *U. fasciata* and on the other hand, between *U. linzea* and *U. compressa*.

The reliable taxonomic identification of *Ulva* species is unlikely to be obtained on the basis of morphology alone (Malta et al., 1999).

Conclusion

The present investigation represented initial steps in creating a reliable database on morphological, genetic and biochemical variation between *Ulva* spp. collected from Eastern Harbor, Alexandria, Egypt. Taxonomical study of seaweeds should be not depend on morphological description and biochemical composition only because were not enough for differentiation between seaweeds especially *Ulva* species. These characters more affected by age, seasonal changes so it should be used genetic methods which are more specialization and accuracy, while RAPD-PCR is useful in differentiation between *Ulva* species. It may also be useful in detecting relationship between species within a genus. Future work in the seaweeds differentiation and classification should be performed by modern genetic technology to study the variation between different species.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Abbott I.A., Hollenberg I.G. Marine algae of California. Stanford University Press, 1976.
- Aleem A.A. The marine Algae of Alexandria, Egypt. Egypt: Univ. of Alexandria, Faculty of Science, 1993.
- AOAC. Official methods of analysis of AOAC International, 16th edn., AOAC Int., Washington, 1995.
- AOAC. Official methods of analysis of AIAC International, 16th edn., AOAC Int., Washington, 2000.
- Bardakci F. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. Turk. J. Biol. 2001;25:185-196.
- Bliding C. A critical survey of European taxa in Ulvales. II. *Ulva*, *Ulvaria*, *Monostroma*, *Kornmannia*. Bot. Not. 1968;121:535-629.
- Costa L.S., Fidelis G.P., Cordeiro S.L., Oliveira R.M., Sabry D.A., Câmara R.B.G., Nobre L.T.D.B., Costa M.S.S.P., Almeida-Lima J., Farias E.H.C., Leite E.L. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical macroalgae. Biomed. Pharmacother. 2010; 64:21-28.

- Dawes C.J. Marine Botany. New York: John Wiley and Sons, Inc., 1988.
- Dere S., Dalkıran N., Karacaoğlu D., Yıldız G., Dere E. The determination of total protein, total soluble carbohydrate and pigment contents of some macroalgae collected from Gemlik-Karacaali (Bursa) and Erdek-Ormanlı (Balıkesir) in the Sea of Marmara, Turkey. Oceanologia. 2003;45(3):453-471.
- Dhargalkar V.K., Jagtap T.G., Untawale A.G. Biochemical constituents of seaweeds along the Maharashtra coast. Indian J. Marine Sci. 1980;9(4):297-299.
- Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull. 1987;19:11-15.
- Dubois M., Gillies K.A., Hamilton J.K., Robbers P.A., Smith F. Calorimetric method for determination of sugar and related substances. Anal. Chem. 1956;28:350-352.
- Dural B., Demir N. Ecological, anatomical and morphological studies on *Ulva rigida* C. Agardh (Ulvaceae, Chlorophyta) in the coast of İzmir (Aegean Sea – Turkey). Tarım Bilimleri Dergisi. 2001;7(3):74-80.
- Fleurence J. Seaweed proteins: biochemical nutritional aspects and potential uses. Trends Food Sci. Technol. 1999;10:25-28.
- Guidone M., Thornber A., Wysor B., O'Kelly C.J. Molecular and morphological diversity of Narragansett Bay (RI, USA) *Ulva* (Ulvales, Chlorophyta) populations. J. Phycol. 2013;49:979-995.
- Guiry M.D., Guiry G.M. 2011 AlgaeBase. World-wide electronic publication, Nat. Univ. of Ireland, Galway. Available at <http://www.algaebase.org>.
- Hayden H.S., Blomster J., Maggs C.A., Silva P.C., Stanhope M.J., Waaland J.R. Linnaeus was right all along: *Ulva* and *Enteromorpha* are not distinct genera. Eur. J. Phycol. 2003;38:277-294.
- Heech S., Broom J.E.S., Neill K.F., Farr T.J., Dalen J.L., Nelson W.A. *Ulva*, *Umbraulva* and *Gemina*: genetic survey of New Zealand taxa reveals diversity and introduced species. Eur. J. Phycol. 2009;44: 143-154.
- Ichihara K., Arai S., Uchimura M., Fay E.J., Ebata H., Hiraoka M., Shimada S. New species of freshwater *Ulva*, *Ulva limnetica* (Ulvales, Ulvophyceae) from the Ryukyu Islands, Japan. Phycol. Research. 2009;57:94-103.
- Israel B.A., Cummings K.M., Dignan M.B., Heaney C.A., Perales D.P., Simons-Morton B.G., Zimmerman M.A. Evaluation of health education programs: current assessment and future directions. Health Education & Behavior. 1995;22(3):364-389.
- Jeffrey S.W., Humphrey G.F. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c*₁ and *c*₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton. Biochemie Physiol. Pflanzen. 1975;167(2): 191-194.
- Jha B., Reddy C.R.K., Thakur M.C., Rao M.U. Seaweeds of India: the Diversity and Distribution of Seaweeds of the Gujarat Coast. Dordrecht; Heidelberg; London; New York: Springer, 2009.
- Khairy H.M., El-Shafay S.M. Seasonal variations in the biochemical composition of some common seaweed species from the coast of Abu Qir Bay, Alexandria, Egypt. Oceanologia. 2013;55(2):435-452.
- Koeman R.P.T., van den Hoek C. The taxonomy of *Ulva* (Chlorophyceae) in the Netherlands. Br. Phycol. J. 1981;16:9-53.
- Kokilam G., Vasuki S. Biochemical and phytochemical analysis on *Ulva fasciata* and *Caulerpa taxifolia*. Int. J. Pharmaceut. Sci. Research. 2014;4(1):7-11.
- Kong F., Mao Y., Cui F., Zhang X., Gao Z. Morphology and molecular identification of *Ulva* forming green tides in Qingdao China. J. Ocean Univ. of China. 2011;10:73-79.
- Loughnane C.J., McIvor L.M., Rindi F., Stengel D.B., Guiry M.D. Morphology, *rbcL* phylogeny and distribution of distromatic *Ulva* (Ulvophyceae, Chlorophyta) in Ireland and southern Britain. Phycol. 2008;47:416-429.
- Malta E., Stefano G., Draisma A., Kamermans P. Free-floating *Ulva* in the southwest Netherlands: species or morphotypes? A morphological, molecular and ecological comparison. Eur. J. Phycol. 1999;34: 443-454.
- McDermid K.J., Stuercke B. Nutritional composition of edible Hawaiian macroalgae. J. Appl. Phycol. 2003;15:513-524.

- Moustafa Y.T.A., Saeed M.S. Nutritional evaluation of green macroalgae, *Ulva* sp. and related water nutrients in the Southern Mediterranean Sea coast, Alexandria shore, Egypt. Egypt. Acad. J. Biol. Sci. 2014;5(1):1-19.
- Mshigeni K.E., Kajamulo A.A. Effects of the environment on polymorphism in *Ulva fasciata* Delile (Chlorophyta, Ulvaceae). Botanica Marina. 1979;22:145-148.
- O'Kelly C.J., Kurihara A., Shipley T.C., Sherwood A.R. Molecular assessment of *Ulva* spp. (Ulvophyceae, Chlorophyta) in the Hawaiian Islands. J. Phycol. 2010;46:728-735.
- Pasad U., Deshmukhe G., Dwivedi A., Singh S.D. Detection of genetic variation in four *Ulva* species based on RAPD technique. Indian J. Marine Sci. 2009;38(1):52-56.
- Pettett P. Preliminary investigation into the induction of reproduction in *Ulva* spp. in Southeast Queensland for mass cultivation purposes: Masters in environmental change management. Univ. of the Sunshine Coast, Faculty of Science, 2009.
- Phillips J.A. Field, anatomical and development studies on southern Australia species of *Ulva* (Ulvaceae, Chlorophyta). Australian Syst. Botany. 1988;1(4):411-456.
- Reed R.H., Russell G. Adaptation to salinity stress in populations of *Enteromorpha intestinalis* (L.) Link. Estuarine. Coastal Marine Sci. 1979;8:251-258.
- Richard S., Peter H. Community Analysis Package 4.0. Searching for structure in community data. UK: Lymington, 2007.
- Ridley S.M. Interaction of chloroplasts with inhibitors. Induction of chlorosis by diuron during prolonged illumination *in vitro*. Plant Physiol. 1977;59:724-732.
- Shimada S., Tadano T., Tanaka J. A new species *Codium tenuifolium* (Codiales, Chlorophyta) from Japan. Jpn J. Botany. 2007;82:117-125.
- Shimada S., Yokoyama N., Arai S., Hiraoka M. Phylogeography of genus *Ulva* (Ulvophyceae, Chlorophyta), with special reference to the Japanese freshwater and brackish taxa. J. Appl. Phycol. 2008;20:979-989.
- Tan I.H., Blomster J., Hansen G., Leskinen E., Maggs C.A., Mann D.G., Sluiman H.J., Stanhope M.J. Molecular phylogenetic evidence for a reversible morphogenetic switch controlling the gross morphology of two common genera of green seaweeds, *Ulva* and *Enteromorpha*. Mol. Biol. Evol. 1999;16:1011-1018.
- Tanner C.E. Investigations of the taxonomy and morphological variation of *Ulva* (Chlorophyta): *Ulva californica*. Phycologia. 1986;25(4):510-520.
- Taylor W.R. Marine Algae of the Eastern Tropical and Subtropical Coasts of the Americas. Univ. of Michigan Press, Ann Arbor, 1960; 870-880.
- van den Hoek C., Mann D.G., Jahns H.M. Algae. An Introduction to Phycology. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1995.
- Wijesekara I., Pangestuti R., Kim S.K. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. Carbohydrate Polymers. 2011;84:14-21.
- Williams J.G.K., Hanafey M.K., Rafalski J.A., Tingey S.V. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. Methods Enzymol. 1993;218:704-740.
- Wolf M.A., Sciuto K., Andreoli C., Moro I. *Ulva* (Chlorophyta, Ulvales) biodiversity in the North Adriatic Sea (Mediterranean Italy): Cryptic species and new introductions. J. Phycol. 2012;48:1510-1521.
- Wong K.H., Cheung P.C.K. Nutritional evaluation of some subtropical red and green seaweeds. Part I. Proximate composition, amino acid profile and some physico-chemical properties. Food Chemistry. 2001;71:475-482.

Порядок митохондриальных генов как дополнительный маркер в филогенетических исследованиях насекомых

Ф.С. Шарко¹, А.В. Недолужко²✉, С.М. Расторгуев², С.В. Цыганкова², Е.С. Булыгина², А.А. Полилов³,
Е.Б. Прохорчук^{1, 3}, К.Г. Скрыбин^{1, 2, 3}

¹ Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

³ Биологический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

За миллионы лет эволюции геномы современных насекомых накопили значительное количество мутаций. Геномные различия некоторых представителей класса Insecta, принадлежащих одному семейству или отряду, настолько велики, что могут завести в тупик при проведении филогенетических исследований и требуют использования нетрадиционных методов анализа. Известно, что молекулярная эволюция идет не только путем единичных нуклеотидных замен, но и включает в себя более крупные геномные перестройки, такие как изменение порядка генов. Гены митохондриальной ДНК (мтДНК) достаточно часто используются в качестве маркера для филогенетических исследований у многих организмов, в том числе членистоногих, поскольку мтДНК многокопийна, наследуется по материнской линии, не подвержена рекомбинации и достаточно быстро (относительно ядерного генома) накапливает мутации. К настоящему времени в общедоступных базах данных собрано большое количество полных нуклеотидных последовательностей митогеномов (тысячи организмов), однако их филогенетический анализ имеет свои сложности, особенно для представителей класса Насекомые (Insecta), чья эволюция занимает значительный отрезок геологического времени. Целью данного исследования была оценка возможности использования новых методических приемов филогенетического анализа насекомых. Сравниваются два способа филогенетического анализа. Первый метод использует изменчивость нуклеотидной последовательности мтДНК, второй – порядок генов в полных митохондриальных геномах как дополнительный маркер. Показано, что порядок генов может быть применен в качестве дополнительного маркера при филогенетических исследованиях представителей отряда Hymenoptera. Разработана программа mitoSpider, с помощью которой выявлены 63 последовательности митогеномов насекомых, где количества генов отличаются от стандартного (для высокоорганизованных Metazoa).

Ключевые слова: порядок генов; митохондриальная ДНК; насекомые, Hymenoptera; перепончатокрылые; mitoSpider; CYTB; филогения.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Шарко Ф.С., Недолужко А.В., Расторгуев С.М., Цыганкова С.В., Булыгина Е.С., Полилов А.А., Прохорчук Е.Б., Скрыбин К.Г. Порядок митохондриальных генов как дополнительный маркер в филогенетических исследованиях насекомых. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(3):368-373. DOI 10.18699/VJ17.254

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Sharko F.S., Nedoluzhko A.V., Rastorguev S.M., Tsygankova S.V., Boulygina E.S., Polilov A.A., Prokhortchouk E.B., Skryabin K.G. The mitochondrial gene order and CYTB gene evolution in insects. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(3):368-373. DOI 10.18699/VJ17.254

Received 24.10.2016
Accepted for publication 04.02.2017
© AUTHORS, 2017

✉ e-mail: nedoluzhko@gmail.com

The mitochondrial gene order and CYTB gene evolution in insects

F.S. Sharko¹, A.V. Nedoluzhko²✉, S.M. Rastorguev²,
S.V. Tsygankova², E.S. Boulygina², A.A. Polilov³,
E.B. Prokhortchouk^{1, 3}, K.G. Skryabin^{1, 2, 3}

¹ Institute of Bioengineering, Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" RAS, Moscow, Russia

² National Research Centre "Kurchatov Institute", Moscow, Russia

³ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow, Russia

Over millions of years of evolution, the genomes of modern insects have accumulated a significant number of mutations, which often can lead up a blind alley when carrying out phylogenetic research. Genomic differences between some representatives belonging to the same family or group are often so great that they demand using nonconventional methods of the phylogenetic analysis. It is known that molecular evolution goes by the way of not only single nucleotide substitutions, but also by larger genomic reorganizations, such as insertion or deletion of large genome fragments, and even changing the order of genes. Mitochondrial DNA genes (mtDNA) are quite often used as markers for phylogenetic research into many organisms including arthropods, because mtDNA is multicopied, is inherited maternally, does not undergo recombination and accumulates mutations quickly enough (relative to the nuclear genome). To date, a large number of full nucleotide sequences of mitogenomes (thousands of organisms) has been deposited in public databases; however, their phylogenetic analysis has obstacles, especially for representatives of the insects (Insecta), whose evolution takes a considerable part of geological time. In this work we describe the application and a comparison of two ways of the phylogenetic analysis for different groups of insects. The first method uses the variability of the nucleotide sequence of mtDNA, and the second one analyses the order of genes in full mitochondrial genomes of insects that can be used as an additional marker in phylogenetic research into representatives of the order Hymenoptera.

Key words: gene order; mitochondrial DNA; Insects; Hymenoptera; mitoSpider; CYTB; phylogeny.

Появление и развитие методов современного секвенирования ДНК (next-generation sequencing – NGS) способствовало значительному прогрессу в эволюционной биологии, включая проведение многочисленных работ в области геномики, транскриптомики или эпигеномики. К настоящему времени применение NGS-технологий стало рутинной процедурой, которую используют многие исследовательские группы, в том числе в России (Rastorguev et al., 2013; Nedoluzhko et al., 2016; Sokolov et al., 2016). Успех этих методов привел к экспоненциальному росту количества отсеквенированных и аннотированных геномов (ядерных и митохондриальных), которые депонированы в различные общедоступные базы данных. Эти последовательности ДНК активно применяются в филогенетических и филогеномных исследованиях.

Гены митохондриальной ДНК (мтДНК) считаются признанными молекулярными маркерами и задействованы в различных эволюционных исследованиях, посвященных систематике и генетическому разнообразию животных и растений. В последнее время для подобных работ стали использоваться полные последовательности митохондриальных геномов, которые более информативны, нежели отдельные гены мтДНК, их фрагменты или некодирующие регионы (Li et al., 2012; Mao et al., 2015).

Количество генов в митохондриальном геноме эукариот (включая одноклеточные) варьирует от таксона к таксону: например, число белок-кодирующих генов может меняться от 3 до 67, а гены транспортных РНК (тРНК) и вовсе могут отсутствовать (Adams, Palmer, 2003). Митогеном многоклеточных животных, за исключением представителей типа Knidaria, в большинстве случаев содержит 37 генов: 13 белок-кодирующих генов, 22 гена тРНК и два гена рибосомальной РНК (Castellana et al., 2011; Kayal et al., 2012).

В ранее опубликованных работах, посвященных определению последовательности и порядку генов в мтДНК насекомых (Babbucci et al., 2014; Jiang et al., 2016; Nedoluzhko et al., 2016), высказано предположение, что количество генов и их порядок значительно варьируют внутри как небольших, так и более крупных таксонов высокоорганизованных эукариот (например, членистоногих). Более того, данные о количестве, дубликациях и элиминировании митохондриальных генов могут служить дополнительным источником информации для понимания филогенетических взаимосвязей эволюционно древних животных, позволяя уточнить (в том числе с помощью разнообразных биоинформатических подходов) филогенетическое положение конкретного таксона.

Настоящее исследование направлено на оценку возможностей использования новых методических приемов филогенетического анализа у насекомых. Для анализа опубликованных в базе данных NCBI (Национальный центр биотехнологической информации США) митохондриальных геномов насекомых применялись data mining технологии. Нами разработана программа mitoSpider, которая позволяет оценить количество генов в опубликованных последовательностях мтДНК.

Найденные последовательности митохондриальных геномов представителей отрядов насекомых Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, Lepidoptera и Orthoptera

(наиболее часто представлены в базе NCBI) были использованы для проведения филогенетического анализа, опирающегося на порядок генов. Параллельно для представителей этих же отрядов выполнялся филогенетический анализ на основе изменчивости нуклеотидной последовательности гена цитохрома b (*CYTB*) и всех белок-кодирующих генов (CDS) мтДНК. Показано, что филогенетическое дерево, построенное в соответствии с порядком генов в мтДНК у отряда Hymenoptera, в основном совпало с филогенетическим деревом, построенным с использованием нуклеотидной последовательности гена *CYTB*. Поскольку в отрядах Hemiptera, Diptera, Coleoptera, Orthoptera, и Lepidoptera порядок генов в мтДНК фактически неизменен, филогенетическая реконструкция по этому признаку невозможна. Продемонстрировано, что взятый в качестве маркера порядок генов делает топологию филогенетического дерева более точной, приближая ее к топологии, построенной по всем белок-кодирующим генам у Hymenoptera. Кроме того, в статье обсуждается обнаруженное значительное число митохондриальных геномов насекомых, количество генов в которых отличается от стандартного набора (37 генов).

Материалы и методы

Для сбора информации в базе данных NCBI, на языке Perl авторами была написана программа mitoSpider, основанная на EntrezAPI (API ncbi) (исходный код программы доступен по адресу: <https://github.com/megaphragma/mitoSpider>). Программа позволяет получить статистику по генам и их порядку в митогеномах, также с ее помощью можно получить нуклеотидные последовательности выбранных организмов, которые представлены в открытом доступе. Данный программный продукт использовался для сбора статистики о количестве генов и их порядке в митохондриальных геномах всех насекомых, представленных в базе данных (mitoSpider может применяться для таксонов произвольного ранга).

С помощью mitoSpider все митогеномы насекомых, по названиям которых можно было определить, что они неполные и/или дублирующиеся (разные версии генома одного и того же вида), отфильтровывались на предварительной стадии. В итоге статистику по количеству генов и их порядку собирали для 895 последовательностей мтДНК насекомых.

Полные митохондриальные геномы насекомых из отрядов Двукрылые (Diptera), Жесткокрылые (Coleoptera), Прямокрылые (Orthoptera), Полужесткокрылые (Hemiptera), Перепончатокрылые (Hymenoptera) и Чешуекрылые (Lepidoptera) были отобраны для построения филогенетических реконструкций на основе порядка генов в их последовательности при помощи программы MLGO (Hu et al., 2014) со стандартными настройками, которая использует метод максимального правдоподобия для статистической модели. Для возможности сравнения порядка генов у разных видов гены были расположены согласно их последовательности в митогеноме, начиная с *tRNA-Ile* и следующих за ним генов *tRNA-Gln* и *tRNA-Met*.

Параллельно в программе MEGA 7.0 и методом максимального правдоподобия (Maximum likelihood) для кластеризации (Kumar et al., 2016) с моделью замен Тамуры–Нея

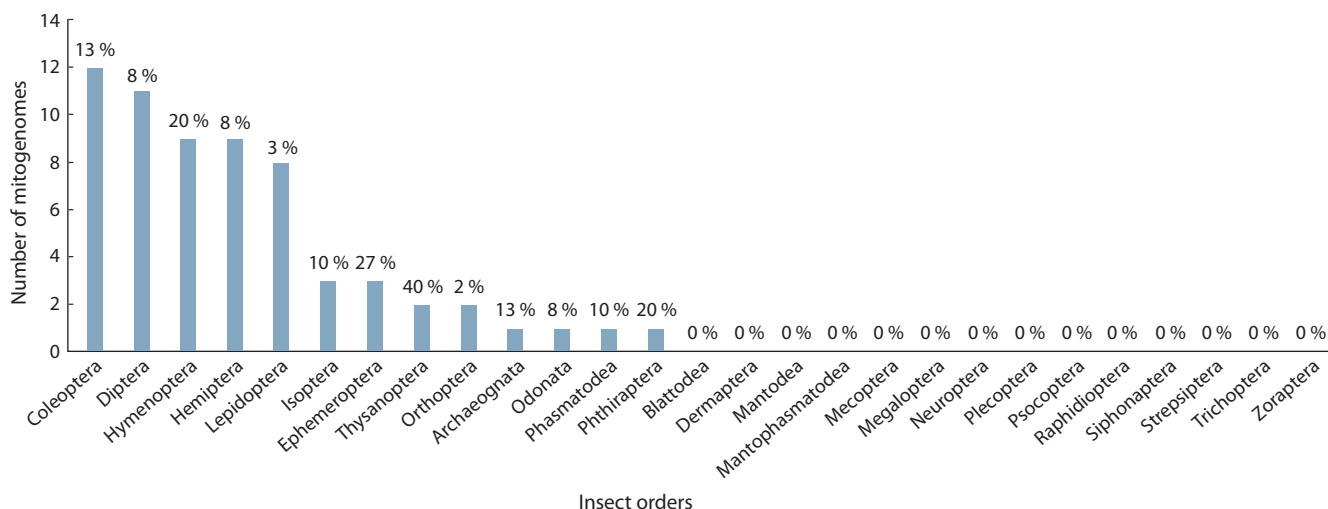


Fig. 1. The number of annotated mitogenomes of Insecta (June 2016) with deviations from the standard numbers of genes and their percentages in the total number of mitogenomes in each order.

проводился филогенетический анализ с использованием нуклеотидной последовательности гена *CYTB* из всех отобранных ранее полных последовательностей мтДНК. Нуклеотидные последовательности предварительно были выровнены с помощью алгоритма ClustalW. Таким же методом реконструировались филогенетические деревья по 13 белок-кодирующим генам для выбранных отрядов насекомых. Объединение информации по последовательности нуклеотидов гена *CYTB* и порядку генов выполняли в программе TNT, используя встроенный скрипт “hybtree.run” (Goloboff et al., 2008).

Топологию филогенетических деревьев, построенных с помощью двух подходов, сравнивали, используя программу TreeKO со стандартными параметрами. В результате проведенного анализа получали значение дистанций (strict distance) между двумя топологиями. Искомая дистанция представляет собой расстояние между двумя деревьями, если отсутствие исключений для эволюционно значимых событий не принимается во внимание. Таким образом, чем ближе дистанция TreeKO к нулю, тем ближе топологии ветвления построенных деревьев, а чем ближе к единице, тем сильнее топологии различаются (Huerta-Cepas et al., 2010; Marcet-Houben, Gabaldón, 2011).

Результаты

Программа mitoSpider позволила обнаружить 895 полных митохондриальных геномов насекомых в базе данных NCBI (июнь 2016 г.) (<http://www.treefrog.ru/geneorder/Приложение1.xlsx>), причем в 63 из них были выявлены отклонения от стандартного количества генов (больше или меньше 37). На рис. 1 показано распределение «нестандартных» митохондриальных геномов по различным отрядам класса Насекомые и их процентное соотношение относительно общего числа опубликованных митогеномов.

Из общей выборки митогеномов, отсортированных при помощи mitoSpider, были взяты последовательности мтДНК шести отрядов насекомых: Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, Lepidoptera и Orthoptera (наиболее часто представлены в базе NCBI). С использованием этих

митогеномов было построено шесть филогенетических деревьев (Доп. материалы)¹, основанных на порядке генов (метод Maximum likelihood) (рис. 2), и еще шесть филогенетических деревьев (метод Maximum likelihood) – на данных об изменчивости митохондриального гена *CYTB*.

Топологии филогенетических деревьев были проанализированы с помощью программы TreeKO. Показано, что филогенетические деревья, построенные на основании порядка генов митохондриальных геномов Hymenoptera, в значительной степени совпали с теми, которые были построены с использованием нуклеотидной последовательности гена *CYTB*, в отличие от других отрядов насекомых (Hemiptera, Diptera, Coleoptera, Orthoptera и Lepidoptera), где порядок генов фактически неизменен, поэтому не несет дополнительной информации (см. таблицу).

Более того, добавление данных по порядку генов к нуклеотидным последовательностям *CYTB* у Hymenoptera уточняет топологию филогенетического дерева, приближая ее к топологии, построенной по всем белок-кодирующим генам. Значения дистанции TreeKO при сравнении филогении *CYTB* против CDS равны 0.232, в то время как при добавлении данных по порядку генов к нуклеотидным последовательностям *CYTB* они снижались до 0.195. В то же время порядок генов не может быть использован для филогенетических построений представителей Hemiptera, Diptera, Coleoptera, Orthoptera и Lepidoptera, поскольку он идентичен у большинства опубликованных к настоящему времени митогеномов.

Как и в других исследованиях (Dowton, 1999; Mao et al., 2015; Kim et al., 2016), нами показано, что порядок генов в отряде Hymenoptera может различаться даже у представителей одного рода, например у шмелей (*Bombus* sp.) или безжалых пчел (*Melipona* sp.).

Анализ 63 митогеномов насекомых, в которых были выявлены отклонения от стандартного количества генов для Metazoa, показал, что наиболее часто из митохондриального генома насекомых элиминируются гены *trn-Ile* и *ATP8*

¹ Дополнительные материалы см. в Приложении 2 по адресу: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2017-21/appx6.pdf>

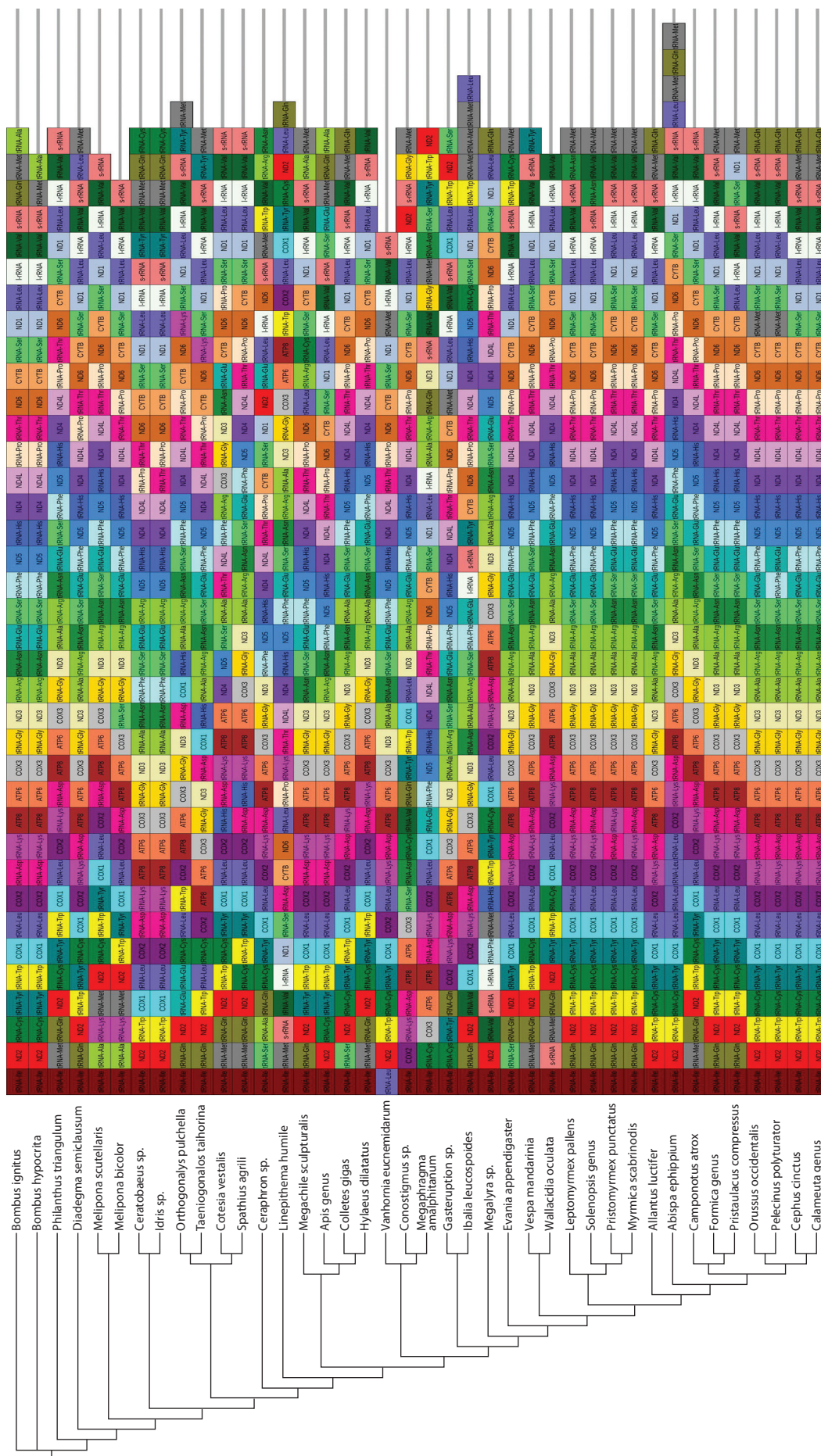


Fig. 2. Phylogenetic tree of Hymenoptera based on the gene order in mitogenomes.

TreeKO distances between two tree topologies based on the mitogenome gene order and sequence variation of the *CYTb* gene

Insecta orders	The number of complete mitochondrial genomes used in the analysis	TreeKO distances between two tree topologies
Lepidoptera	254	0.565
Orthoptera	93	0.516
Diptera	128	0.455
Coleoptera	83	0.319
Hemiptera	102	0.312
Hymenoptera	37	0.271

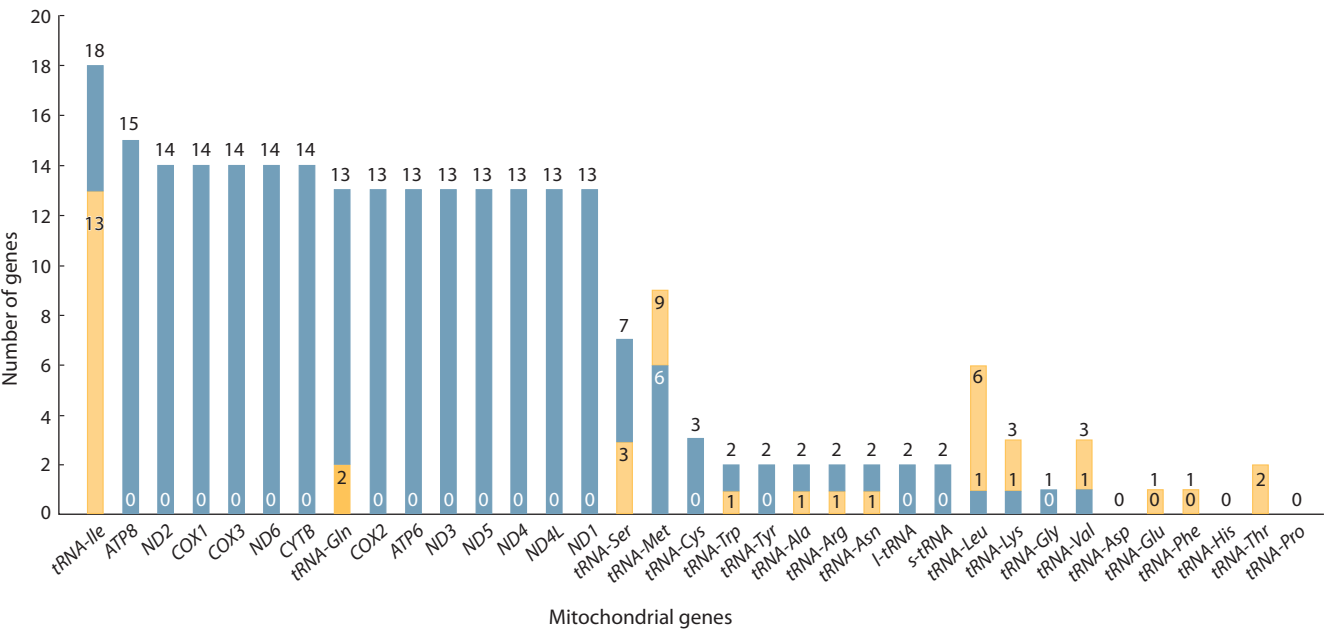


Fig. 3. Mitochondrial genes that are most often missed (marked in black) or duplicated (marked in white).

(не обнаружены в 18 и 15 митогеномах соответственно). Тем не менее мы не выявили каких-либо закономерностей, которые подтвердили бы направленный отбор по этому признаку. По-видимому, события утери некоторых генов в митогеномах насекомых случайны. Более того, нередко даже единичная мутация в гене тРНК может привести к потере его функциональности. Также стоит отметить, что в последовательностях митохондриальных геномов насекомых чаще отсутствуют некоторые белок-кодирующие гены, по сравнению с тРНК и рРНК, к тому же нами не обнаружено ни одного случая дубликации этих генов (рис. 3). Кроме того, типичная нуклеотидная последовательность размером 69 пар оснований, обнаруженная нами между генами *trnQ* и *trnV* в опубликованном ранее митогеноме микроскопического жука *Scydosella musawasensis* (Nedoluzhko et al., 2016), не формировала характерную шпильку при анализе ее вторичной структуры.

Обсуждение

Маркеры мтДНК активно используются в филогенетических исследованиях насекомых, однако подобные реконструкции нередко противоречат друг другу в зависимости

от метода, выбора объектов и генов. На сегодняшний день для уточнения филогенетических связей между организмами применяется дополнительная информация об исследуемых таксонах. В нашей работе в качестве дополнительного маркера был использован порядок генов в митохондриальном геноме насекомых. Полученные результаты показывают перспективность использования информации о порядке генов в качестве дополнительного филогенетического маркера для отдельных видов, родов и семейств перепончатокрылых. Наши данные указывают на то, что информация о порядке генов, добавленная к данным о нуклеотидной последовательности гена *CYTb*, улучшает топологию филогенетических построений, приближая их к филогенетическим деревьям, построенным с использованием всех 13 белок-кодирующих генов мтДНК. Ранее наибольшее число перестроек внутри митохондриального генома Нуменоптера было обнаружено у паразитических видов, и первоначально предполагалось, что существует связь между паразитизмом и многочисленными перестройками в геноме (Dowton, Austin, 1999), однако в дальнейшем эта гипотеза была опровергнута.

В настоящее время принято считать, что эти перестройки эволюционно нейтральны (Boore, Brown, 1998). Некоторые примеры перестроек в митохондриальных геномах были обнаружены и в других, более высокоорганизованных таксонах животных, но их эволюционная ценность остается неясной.

Разработанная нами программа mitoSpider позволила обнаружить 63 последовательности митогеномов насекомых, у которых выявлены отклонения от стандартного количества генов (для высокоорганизованных Metazoa).

Нами показано, что наиболее часто из митохондриального генома насекомых элиминируются некоторые белок-кодирующие гены, которые, вероятно, мигрируют в ядерный геном в процессе эволюции (Berg, Kurland, 2000). Мы предполагаем, что в случае *S. musawasensis* имели место замены, которые деактивировали ген *trnL*. Следует особо отметить, что далеко не все полные митохондриальные геномы с нестандартным количеством генов отсекарованы полностью. По-видимому, столь значительное количество «нестандартных» митогеномов связано с их низкокачественной *de novo* сборкой и секвенированием, а также может объясняться неправильной аннотацией митогеномов при загрузке в базу NCBI, что показано в настоящей работе и в исследованиях наших коллег (Gissi et al., 2008).

Acknowledgments

This work was supported by the Russian Science Foundation, project 14-24-00175.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Adams K.L., Palmer J.D. Evolution of mitochondrial gene content: gene loss and transfer to the nucleus. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2003; 29(3):380-395. DOI 10.1016/S1055-7903(03)00194-5.
- Babbucci M., Basso A., Scupola A., Patarnello T., Negrisola E. Is it an ant or a butterfly? Convergent evolution in the mitochondrial gene order of Hymenoptera and Lepidoptera. *Genome Biol. Evol.* 2014; 6(12):3326-3343. DOI 10.1093/gbe/evu265.
- Berg O.G., Kurland C.G. Why mitochondrial genes are most often found in nuclei. *Mol. Biol. Evol.* 2000; 17(6):951-961.
- Boore J.L., Brown W.M. Big trees from little genomes: Mitochondrial gene order as a phylogenetic tool. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1998; 8:668-674. DOI 10.1016/S0959-437X(98)80035-X.
- Castellana S., Vicario S., Saccone C. Evolutionary patterns of the mitochondrial genome in Metazoa: exploring the role of mutation and selection in mitochondrial protein coding genes. *Genome Biol. Evol.* 2011; 3:1067-1079. DOI 10.1093/gbe/evr040.
- Dowton M. Relationships among the cyclostome braconid (Hymenoptera, Braconidae) subfamilies inferred from a mitochondrial tRNA gene rearrangement. *Mol. Phylogenet. Evol.* 1999; 11:283-287. DOI 10.1006/mpev.1998.0580.
- Dowton M., Austin A.D. Evolutionary dynamics of a mitochondrial rearrangement "hot spot" in the Hymenoptera. *Mol. Biol. Evol.* 1999; 16:298-309.
- Gissi C., Iannelli F., Pesole G. Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species. *Heredity (Edinb.)*. 2008; 101(4):301-320. DOI 10.1038/hdy.2008.62.
- Goloboff P.A., Farris J.S., Nixon K.C. TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics*. 2008; 24:774-786. DOI 10.1111/j.1096-0031.2008.00217.x.
- Hu F., Lin Y., Tang J. MLGO: phylogeny reconstruction and ancestral inference from gene-order data. *BMC Bioinformatics*. 2014; 15(1): 354. DOI 10.1186/s12859-014-0354-6.
- Huerta-Cepas J., Dopazo J., Gabaldón T. ETE: a python Environment for Tree Exploration. *BMC Bioinformatics*. 2010; 11:24. DOI 10.1186/1471-2105-11-24.
- Jiang P., Li H., Song F., Cai Y., Wang J., Liu J., Cai W. Duplication and remodeling of tRNA genes in the mitochondrial genome of *Reduvius tenebrosus* (Hemiptera: Reduviidae). *Int. J. Mol. Sci.* 2016; 17(6): 951. DOI 10.3390/ijms17060951.
- Kayal E., Bentlage B., Collins A.G., Kayal M., Pirro S., Lavrov D.V. Evolution of linear mitochondrial genomes in medusozoan cnidarians. *Genome Biol. Evol.* 2012; 4(1):1-12. DOI 10.1093/gbe/evr123.
- Kim M.J., Hong E.J., Kim I. Complete mitochondrial genome of *Camponotus atrox* (Hymenoptera: Formicidae): a new tRNA arrangement in Hymenoptera. *Genome*. 2016; 59(1):59-74. DOI 10.1139/gen-2015-0080.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 2016; 33(7):1870-1874. DOI 10.1093/molbev/msw054.
- Li H., Liu H., Shi A., Stys P., Zhou X., Cai W. The complete mitochondrial genome and novel gene arrangement of the unique-headed bug *Stenopirates* sp. (Hemiptera: Enicocephalidae). *PLoS ONE*. 2012; 7(1):e29419. DOI 10.1371/journal.pone.0029419.
- Mao M., Gibson T., Dowton M. Higher-level phylogeny of the Hymenoptera inferred from mitochondrial genomes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2015; 84:34-43. DOI 10.1016/j.ympev.2014.12.009.
- Marcet-Houben M., Gabaldón T. TreeKO a duplication aware algorithm for the comparison of phylogenetic trees. *Nucl. Acids Res.* 2011; 39(10):e66.
- Nedoluzhko A., Sharko F., Boulygina E., Tsygankova S., Sokolov A., Mazur A., Polilov A., Prokhortchouk E., Skryabin K. The complete mitochondrial genome of the smallest known free-living insect *Scydosella musawasensis*. *Mitochondrial DNA. Part B*. 2016; 1(1):171-172. DOI 10.1080/23802359.2016.1149785.
- Rastorguev S.M., Nedoluzhko A.V., Mazur A.M., Gruzdeva N.M., Volkov A.A., Barmintseva A.E., Mugue N.S., Prokhortchouk E.B. High-throughput SNP-genotyping analysis of the relationships among Ponto-Caspian sturgeon species. *Ecol. Evol.* 2013; 3(8):2612-2618. DOI 10.1002/ece3.659.
- Sokolov A.S., Nedoluzhko A.V., Boulygina E.S., Tsygankova S.V., Sharko F.S., Gruzdeva N.M., Shishlov A.V., Kolpakova A.V., Rezepkin A.D., Skryabin K.G., Prokhortchouk E.B. Six complete mitochondrial genomes from Early Bronze Age humans in the North Caucasus. *J. Archaeol. Sci.* 2016; 73:138-144. DOI 10.1016/j.jas.2016.07.017.

Генетическое разнообразие видов комплекса *Aporrectodea caliginosa* на территории России

С.В. Шеховцов¹✉, Е.В. Голованова², Н.Э. Базарова¹, Ю.Н. Белова³, Д.И. Берман⁴, Е.А. Держинский⁵,
М.П. Шашков⁶, С.Е. Пельтек¹

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

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Омский государственный педагогический университет», Омск, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Вологодский государственный университет», Вологда, Россия

⁴ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологических проблем Севера Дальневосточного отделения Российской академии наук, Магадан, Россия

⁵ Учреждение образования «Витебский государственный университет им. П.М. Машерова», Витебск, Беларусь

⁶ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения Российской академии наук, Пушкино, Россия

Дождевые черви комплекса *Aporrectodea caliginosa* – обычные обитатели многих антропогенных и естественных биотопов, нередко доминанты сообществ. Считается, что на территории России встречаются два подвида: *A. c. caliginosa* и *A. c. trapezoides*. В последнее время к этому комплексу относят и вид *Aporrectodea longa*. В статье сделана попытка обобщения полученных материалов о генетическом разнообразии названных таксонов червей, собранных нами в России, а также в некоторых точках Беларуси и Казахстана. Подвид *A. c. caliginosa* на территории России представлен двумя филогенетическими линиями – второй и третьей, при этом последняя доминирует (около 73 % образцов). Кроме того, линии имеют различную распространенность: вторая обнаружена практически на всей исследуемой территории, третья встречалась в небольшом количестве точек на периферии обследованной территории. Генетическая изменчивость червей второй линии заметно выше, чем третьей, а время дивергенции почти в три раза больше. Часть образцов, определенных по степени пигментации как *A. c. caliginosa*, имела гаплотип *cox1* *A. c. trapezoides*; результаты анализа ядерных последовательностей подтвердили диагноз. Таким образом, степень пигментации у названного подвида может значительно варьировать. Кроме того, два образца *A. longa* имели последовательности, идентичные последовательностям филогенетической линии 1 этого вида, известной с севера Западной Европы. Это первые случаи выявления в Западной Сибири *A. c. trapezoides* и *A. longa*. Приведенные данные свидетельствуют о том, что в ряду *A. c. caliginosa* – линия 2 – *A. c. caliginosa* – линия 3 – *A. c. trapezoides* и *A. longa* наблюдается снижение и генетической изменчивости и встречаемости.

Ключевые слова: дождевые черви; виды-космополиты; Lumbricidae; Россия; *cox1*; цитохромоксидаза.

Genetic diversity of the *Aporrectodea caliginosa* complex in Russia

S.V. Shekhovtsov¹✉, E.V. Golovanova²,
N.E. Bazarova¹, Yu.N. Belova³, D.I. Berman⁴,
E.A. Derzhinsky⁵, M.P. Shashkov⁶, S.E. Peltek¹

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

² Omsk State Pedagogical University, Omsk, Russia

³ Vologda State University, Vologda, Russia

⁴ Institute of Biological Problems of the North FEB RAS, Magadan, Russia

⁵ P.M. Masherov Vitebsk State University, Vitebsk, Republic of Belarus

⁶ Institute of Physicochemical and Biological Problems of Soil Sciences RAS, Pushchino, Russia

Earthworms of the *Aporrectodea caliginosa* species complex are abundant in many anthropogenic and natural habitats and often predominate in earthworm communities. In Russia, there are two subspecies of the complex, *A. c. caliginosa* and *A. c. trapezoides*; *Aporrectodea longa* was also recently mentioned as a putative member of the complex. In this study, we made an attempt to review available data on the species complex studied based on our collection from Russia, Belarus, and Kazakhstan. The subspecies *A. c. caliginosa* is represented in Russia by two genetic lineages, 2 and 3, the former being the prevalent (about 73 % of the total sample). Additionally, these lineages have different distributions: while lineage 2 was found in almost all locations studied, lineage 3 was detected only in a few samples from the periphery of the region studied. The genetic diversity of lineage 2 significantly exceeded that of lineage 3, and its estimated divergence time was almost three times as high. A subset of individuals with pigmentation characteristic of *A. c. caliginosa* contained *cox1* haplotypes of *A. c. trapezoides*; analysis of nuclear gene sequences confirmed this diagnosis. Thus, pigmentation intensity in this subspecies was demonstrated to vary to a significant degree. In addition, we analyzed two *A. longa* individuals from West Siberia and the Urals; their *cox1* sequences were identi-

cal to those from the lineage 1 of this species from the north of Western Europe. These are the first reports of *A. c. trapezoides* and *A. longa* from West Siberia. On the whole, both genetic diversity and abundance was shown to decrease in the following series: *A. c. caliginosa* lineage 2 – *A. c. caliginosa* lineage 3 – *A. c. trapezoides* and *A. longa*.

Key words: earthworms; peregrine species; Lumbricidae; Russia; *cox1*; cytochrome oxidase.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Шеховцов С.В., Голованова Е.В., Базарова Н.Э., Белова Ю.Н., Берман Д.И., Держинский Е.А., Шашков М.П., Пельтек С.Е. Генетическое разнообразие видов комплекса *Aporrectodea caliginosa* на территории России. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(3):374-379. DOI 10.18699/VJ17.255

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Shekhovtsov S.V., Golovanova E.V., Bazarova N.E., Belova Yu.N., Berman D.I., Derzhinsky E.A., Shashkov M.P., Peltek S.E. Genetic diversity of the *Aporrectodea caliginosa* complex in Russia. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(3):374-379. DOI 10.18699/VJ17.255

Дождевые черви играют ключевую роль в жизни почвенных сообществ и во многом определяют продуктивность почв. В настоящее время описано около 4000 видов дождевых червей (Hendrix et al., 2008), из которых на территории России встречается около 60 (Всеволодова-Перель, 1997). При этом особо важное значение имеет небольшая группа, состоящая из нескольких десятков видов-космополитов (Michaelson, 1903; Hendrix et al., 2006; Tiunov et al., 2006; Hendrix et al., 2008; Blakemore, 2009, 2012). Считается (Hendrix et al., 2008), что до начала голоцена ареал сем. Lumbricidae, включающего в себя приблизительно 385 видов, был ограничен территорией на юге Западной Европы, не подвергавшейся оледенению. За пределы этой зоны смогли выйти всего лишь около 20, большинство из них заселили и другие континенты. Особенно сильны изменения в составе сообществ дождевых червей на землях, находящихся под антропогенным воздействием, однако в естественных местообитаниях космополиты также зачастую вытесняют местные виды (Tiunov et al., 2006).

К этой группе относится и комплекс видов *Aporrectodea caliginosa* Savigny, 1826. Представители его встречаются на всех континентах (за исключением Антарктиды). Нередко утверждают, что черви комплекса *A. caliginosa* – самые многочисленные и часто встречающиеся на сельскохозяйственных землях и лугах умеренной зоны Палеарктики (Pérez-Losada et al., 2009).

Комплекс *A. caliginosa* включает в себя четыре подвида: *A. c. caliginosa* Savigny, 1826; *A. c. trapezoides* Dugés (1828); *A. c. nocturna* (Evans, 1946) и *A. c. tuberculata* (Eisen, 1874) (Pérez-Losada et al., 2009). Первые два встречаются на территории России (Перель, 1979; Всеволодова-Перель, 1997). Следует отметить, что в западной литературе названные таксоны считаются отдельными видами, а в отечественной – подвидами (Всеволодова-Перель, 1997; Pérez-Losada et al., 2009). Этот таксономический вопрос окончательно не разрешен, и в данной работе мы принимаем отечественную систему.

Морфологические различия между подвидами не всегда выражены четко. Так, *A. c. trapezoides* и *A. c. nocturna* пигментированы, а *A. c. caliginosa* и *A. c. tuberculata* – нет; при этом нередко встречаются черви с промежуточной окраской (Pérez-Losada et al., 2009). Считается, что у представителей всех четырех подвидов поясок располага-

ется на одних и тех же сегментах, тем не менее зачастую можно обнаружить отклонения от диагноза (Shekhovtsov et al., 2016a). Различия между подвидами касаются также формы и положения пубертатных валиков, однако описаны различные промежуточные варианты этих признаков (Pérez-Losada et al., 2009).

Известно, что для комплекса *A. caliginosa*, как и для многих других видов дождевых червей, характерна высокая скрытая генетическая изменчивость (Pérez-Losada et al., 2009; Fernández et al., 2011a, 2012, 2013; Porco et al., 2013; Shekhovtsov et al., 2016a). М. Pérez-Losada с коллегами (2009) показали, что в пределах комплекса можно выделить две ветви, одна из которых включает в себя *A. c. caliginosa* и *A. c. tuberculata*, вторая – *A. c. trapezoides* и *A. c. nocturna*. Кроме того, молекулярно-генетические данные дают основания отнести к комплексу еще вид *A. longa* (Ude, 1826), а также, возможно, и некоторые другие средиземноморские виды рода *Aporrectodea*.

Анализ комплекса *A. caliginosa*, проведенный R. Fernández с коллегами (2012), в целом подтвердил выводы М. Pérez-Losada с коллегами (2009): представители *A. longa* также оказались близкими родственниками *A. caliginosa*, как и *A. giardi* (Ribaucourt, 1901) и три вида рода *Nicodrilus* (*N. monticola* Ontenienta & Babio, 2002, *N. tetramammalis* Ontenienta & Babio, 2002 и *N. carochensis* Ontenienta & Babio, 2002). Время дивергенции видов, входящих в комплекс, по данным авторов, приходится на плиоцен–конец миоцена.

Известно, что для многих видов дождевых червей характерно присутствие нескольких сильно дивергировавших филогенетических линий, морфологические различия между которыми обычно не выражены. Для вида *A. longa* это было показано в работе (King et al., 2008); для *A. c. caliginosa* и *A. c. trapezoides* – в статьях (Pérez-Losada et al., 2009; Fernández et al., 2012). Величина генетических расстояний по митохондриальной ДНК между названными линиями соответствовала уровню межвидовых различий (около 10 %), а на филогенетических деревьях в пределах комплекса линии были расположены в самых разных местах. Если основываться лишь на данных молекулярно-генетического анализа, то эти филогенетические линии можно квалифицировать как виды-двойники; тем не менее показано, что они нередко обитают симпатрично и не имеют каких-либо морфологических или экологических

различий. Кроме того, материалов по различиям между ядерными геномами обсуждаемых линий на настоящий момент недостаточно.

Географическая распространенность филогенетических линий изучена слабо. Наиболее подробные данные имеются для *A. c. trapezoides*. R. Fernández с коллегами (2011a, 2013) показали, что подвид включает в себя две филогенетические линии (каждую из которых можно, в свою очередь, разделить на несколько групп), и границу их распространенности можно провести приблизительно по 42-й параллели. Исходя из этого, авторы заключили, что линия 1 имеет евросибирский ареал, а линия 2 – средиземноморский. Этот вывод, однако, может оказаться преждевременным, так как за пределами Испании исследовано мало точек. Кроме того, авторы показали, что в эндемичных популяциях генетическое разнообразие заметно выше, чем в интродуцированных.

Это мнение противоречит заключению D. Porco с коллегами (2013), которые изучали ряд видов сем. Lumbricidae, включая *A. c. caliginosa*, в западноевропейских и североамериканских популяциях. Полученные ими материалы в целом свидетельствуют о том, что генетическое разнообразие эндемичных и интродуцированных популяций сравнимо. Следует отметить, что выводы нуждаются в некотором уточнении, так как выборки были невелики и эндемичность европейских популяций может вызывать сомнение.

В пределах *A. c. caliginosa* авторы обнаружили три филогенетические линии (в работах (Pérez-Losada et al., 2009; Fernández et al., 2012) было упомянуто лишь две). Линия 1 встречена только в Европе и, скорее всего, представляет собой какой-то близкородственный вид. Для линии 2 было характерно некоторое снижение генетического разнообразия в Америке по сравнению с Европой, для линии 3 – одинаково высокий уровень генетического разнообразия.

Наша группа исследовала популяции *A. c. caliginosa* из разных регионов России (Shekhovtsov et al., 2016a). В нашей выборке была обнаружена преимущественно филогенетическая линия 2 подвида, в то время как ареал линии 3 был сильно ограничен. Кроме того, линия 2 во всех регионах, включая Дальний Восток, имеет одинаково большое генетическое разнообразие, тогда как в линии 3 оно заметно снижается с запада на восток. Таким образом, названные филогенетические линии *A. c. caliginosa* имеют совершенно разную геногеографию, хотя никаких морфологических или экологических различий между ними не известно и встречаются они зачастую симпатрично.

В настоящей работе проанализированы полученные нами и литературные данные по генетике представителей комплекса *A. caliginosa* на территории России, Беларуси и Казахстана.

Материалы и методы

Коллекция *A. caliginosa* собрана в 2011–2016 гг., она хранится в лаборатории молекулярных биотехнологий ИЦиГ СО РАН (Новосибирск). Точки сбора показаны на рис. 1. Червей фиксировали 96 % этанолом. Для выделения ДНК использовали несколько хвостовых сегментов особи. Выделение ДНК проводили при помощи наборов фирмы

BioSilica (Новосибирск) в соответствии с протоколом производителя.

Последовательности фрагмента митохондриального гена цитохромоксидазы 1 (*cox1*) амплифицировали при помощи универсальных праймеров LCO1490m (5'-TACTC-AACAA-ATCAG-CAAGA-TATTG-G-3') (Folmer et al., 1994, с модификациями) и COI-E- (5'-TATAC-TTCTG-GGTGTCCGAA-GAATC-A-3') (Bely, Wray, 2004). Использовали следующий профиль амплификации: 2 мин при 94 °C; 35 циклов: 20 с при 94 °C, 20 с при 55 °C, 50 с при 72 °C; 5 мин при 72 °C.

Для амплификации фрагмента гена гистона H3 применяли универсальные праймеры H3a-F (5'-ATGGC-TCGTA-CCAAG-CAGAC-VGC-3') и H3a-R (5'-ATATC-CTTRG-GCATR-ATRGT-GAC-3'), взятые из работы (Colgan et al., 1998), со следующим профилем амплификации: 2 мин при 94 °C; 5 циклов: 20 с при 94 °C, 20 с при 45 °C, 50 с при 72 °C; 30 циклов: 20 с при 94 °C, 20 с при 53 °C, 50 с при 72 °C; 5 мин при 72 °C.

Секвенирование полученных фрагментов проводили при помощи набора BigDye 3.1 (Applied Biosystems). Капиллярный электрофорез был выполнен в Коллективном центре секвенирования СО РАН (Новосибирск). Ручную обработку полученных последовательностей проводили в программе Chromas. Вычисление гаплотипического и нуклеотидного разнообразия и анализ распределения попарных замен выполнены в программе Arlequin v.3.1 (Excoffier et al., 2005).

Для анализа данных были взяты последовательности *cox1* *A. c. caliginosa*, опубликованные в наших предыдущих работах: KP789177–KP789310, KF471787–92, KF471831–KF471842 (Shekhovtsov et al., 2014a); KF471778–KF471786, KF471793–KF471830, KF471843–KF472049, KU358729–KU358873 (Shekhovtsov et al., 2016a). Кроме того, исследованная выборка включала в себя последовательности из статей (Porco et al., 2013; Martinsson et al., 2015).

Результаты и обсуждение

В ходе работы секвенировано 125 последовательностей представителей комплекса *A. caliginosa*, а 436 взято из наших предыдущих работ. В выборке с территории России и сопредельных государств 460 особей относились к митохондриальной линии 2, а 90 – к линии 3. Кроме того, для *A. c. caliginosa* анализировали и выборку, включающую в себя наряду с указанными выше последовательностями еще и материалы зарубежных исследователей. Эта полная выборка состояла из 496 последовательностей филогенетической линии 2 и 180 последовательностей линии 3.

Обнаружено, что линия 3 на территории нашей страны встречается значительно реже линии 2. В нашей выборке она составляла лишь 16.4 % от общего числа особей *A. c. caliginosa*. Ареал ее также заметно меньше, чем линии 2: из рис. 1 видно, что большая часть червей этой линии собрана на периферии нашей выборки. Более того, в пределах каждой из проанализированных точек сбора (за исключением г. Петропавловска-Камчатского) линия 3 встречалась совместно с линией 2. Показатели генетической изменчивости линии 3 заметно ниже (см.

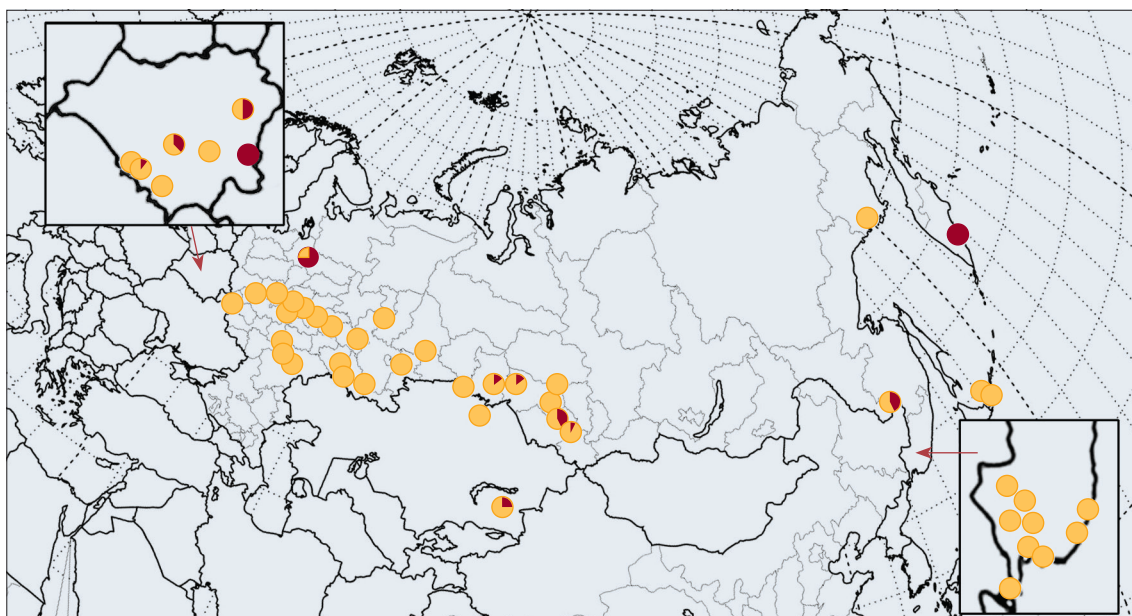


Fig. 1. Localities of *A. c. caliginosa* sampling for this work.
Yellow circles, lineage 2; red circles, lineage 3. Sector areas are proportional to the shares of the lineages.

Genetic diversity of the *A. caliginosa* complex in our specimens

Lineage	N	n	s	h (SD)	pi (SD)
<i>A. c. caliginosa</i> L2	460	50	57	0.940 (0.005)	0.01267 (0.0065)
<i>A. c. caliginosa</i> L3	90	10	30	0.755 (0.033)	0.0036 (0.0022)
<i>A. c. trapezoides</i> L1	9	1	–	–	–
<i>A. longa</i>	2	1	–	–	–

N, number of individuals; n, number of unique haplotypes; s, number of polymorphic sites; h (SD), haplotypic diversity (standard deviation); pi (SD), nucleotide diversity (standard deviation).

таблицу). Следует уточнить, что в Беларуси выявлено в общей сложности восемь гаплотипов, тогда как во всей азиатской части России – всего три.

Отчасти эти различия можно объяснить тем, что большая часть образцов собрана в восточных районах, где филогенетическая линия 3 редка. Тем не менее включение в выборки последовательностей из зарубежных популяций существенно не изменило соотношение генетической изменчивости линий. Так, параметр τ , получаемый при анализе попарных замен и оценивающий время дивергенции между выборками, для полной выборки линии 2, включавшей в себя и все доступные зарубежные образцы, составлял 11.889 (интервал 95 % вероятности 5.990–15.543), а для линии 3 – 3.988 (1.750–5.352). Значения этого параметра пропорциональны возрасту линий. Если принять оценку скорости молекулярных часов равной 2.4 % на нуклеотид на миллион лет (Fernández et al., 2012), а срок жизни поколения – двум годам (Шашков, 2016), то время дивергенции линии 2 можно оценить как 753 тыс. лет (379–984 тыс. лет), линии 3 – 253 тыс. лет (111–339 тыс. лет).

Меньшая встречаемость линии 3 по сравнению с линией 2 обусловлена, вероятно, меньшей численностью интродуцированных особей, что ведет к уменьшению генетического разнообразия. Кроме того, расселение линии 3 на восток было не постепенным, а скачкообразным, о чем говорит присутствие ее в Западной Сибири при полном отсутствии в нашей довольно обширной выборке с востока Восточно-Европейской равнины и Урала.

Последовательности *cox1* девяти образцов из четырех точек (рис. 2) оказались идентичны одному из гаплотипов *A. c. trapezoides* из работы (Fernández et al., 2011a), а именно клону 8, относящемуся к филогенетической линии 1, группе С. Линия 1, в отличие от линии 2 этого подвида, по мнению авторов (Fernández et al., 2011a), имеет евросибирский ареал, а группа С была обнаружена на юге Франции и в Польше. Для этой линии характерно высокое генетическое разнообразие, в то время как в нашей выборке, несмотря на заметное расстояние между географическими точками, обнаружен лишь один вариант последовательности *cox1*. Сказанное может свидетельствовать о том, что при расселении *A. c. trapezoides* на восток происходило

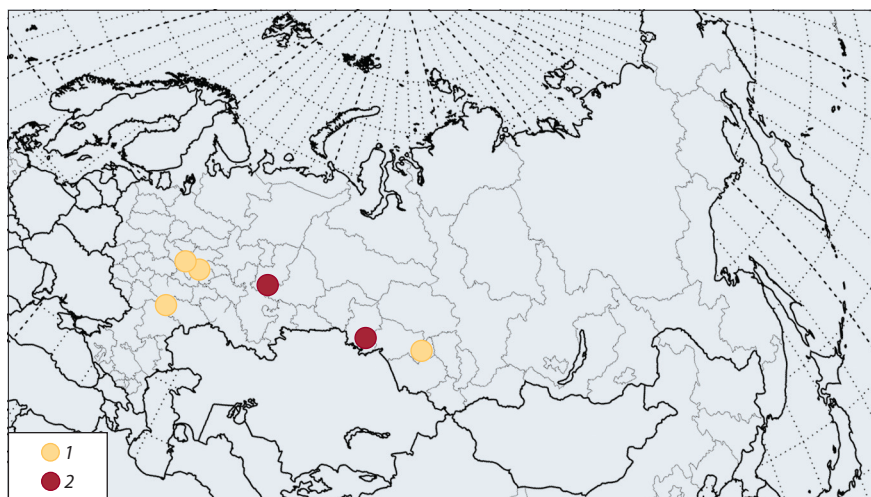


Fig. 2. Localities of *A. c. trapezoides* (1) и *A. longa* (2) sampling for this work.

заметное уменьшение генетического разнообразия, аналогично выявленному для линии 3 *A. c. caliginosa*.

У всех червей, по генетическим данным отнесенных к *A. c. trapezoides*, отсутствовала пигментация. Более того, во всех случаях особи обоих подвидов были обнаружены симпатрично и никаких морфологических различий между собой не имели. Присутствие гаплотипов *A. c. trapezoides* могло означать как действительную симпатрию двух подвидов, так и интрогрессию мтДНК от одного подвида к другому (случаи предполагаемой гибридизации между видами и отсутствия различий между ядерными геномами при сильно различающихся мтДНК встречаются нередко) (Shekhovtsov et al., 2014b, 2016b; Giska et al., 2015; Martinsson et al., 2016). Заметим, что *A. c. trapezoides* является партеногенетическим, в отличие от *A. c. caliginosa* (Omodeo, 1952; Гарбар и др., 2007), но между различными его популяциями степень развития половой системы может варьировать от практически полноценной до полностью дегенерировавшей (Fernández et al., 2011b), т. е. вероятность хотя бы редкого обмена генами между этими подвидами в прошлом исключить нельзя. Для того, чтобы выяснить, какая из этих гипотез верна, мы просеквенировали ядерные последовательности гена гистона H3 у некоторых образцов и обнаружили, что идентификация по мтДНК совпадает с таковой по ядерным генам. Таким образом, непигментированный *A. c. trapezoides* действительно встречается симпатрично с линией 2 *A. c. caliginosa*. Кроме того, найденные нами на площадке возле теплиц ИЦиГ СО РАН представители этого подвида – первая находка его в Сибири.

Так как М. Pérez-Losada с коллегами (2009) и R. Fernández с коллегами (2012) отнесли *A. longa* к комплексу *A. caliginosa*, мы также прогенотипировали два образца этого червя из окрестностей Омска и Краснокамска (см. рис. 2). Известно, что в пределах данного вида выделены две митохондриальные филогенетические линии (Martinsson et al., 2016). Анализ рибосомальных спейсеров и гистоновых генов, однако, показал, что на уровне ядерного генома различия между этими линиями практически не выражены (Martinsson et al., 2016).

Оба наших образца имели идентичные последовательности *cox1*, которые относились к линии 1 *A. longa*. Известно, что эта линия имеет значительно более ограниченную распространенность по сравнению с линией 2 и до сих пор была обнаружена лишь в Великобритании, Норвегии, Швеции и Канаде. Таким образом, наши данные заметно расширяют ее ареал.

Наиболее актуальной на данный момент сводкой по дождевым червям России можно, безусловно, назвать монографию «Дождевые черви фауны России: кадастр и определитель» (Всеволодова-Перель, 1997). В этой работе *A. c. caliginosa* в Западной Сибири отнесен к синантропным видам и отмечен лишь в немногих точках. Прочие сочлены комплекса не отмечены ни в Западной

Сибири, ни на Урале. В настоящее время *A. c. caliginosa* на юге Западной Сибири – один из самых распространенных дождевых червей вблизи больших городов, где он обычен не только на полях и в огородах, но и во многих естественных биотопах. Таким образом, можно предполагать существенное расширение ареалов всех представителей комплекса на восток. Маловероятно, чтобы эти банальные и, как правило, массовые виды были пропущены специалистами, однако нельзя исключить эту возможность, поскольку исследователей и, соответственно, публикаций по Сибири в целом немного.

Заметим, что в данной работе приведены первые находки *A. c. caliginosa* для Магаданской и Еврейской автономной областей, а *A. c. trapezoides* и *A. longa* – для Западной Сибири (см. рис. 1, 2). Кроме того, *A. caliginosa* неустановленного подвида обнаружен нами в окрестностях г. Хабаровска, но не использован в генетическом анализе.

Таким образом, известный ранее ареал представителей комплекса *A. caliginosa* заметно расширен. В ряду *A. c. caliginosa* линия 2 – *A. c. caliginosa* линия 3 – *A. c. trapezoides* и *A. longa* наблюдается уменьшение и генетического разнообразия, и частоты их встречаемости. Конечно, малый объем выборки обуславливает сокращение генетического разнообразия. Тем не менее можно предполагать, что именно различие в числе успешных событий интродукции привело к наблюдаемой разнице во встречаемости представителей комплекса и в их генетическом разнообразии.

Acknowledgments

This study was supported by State Budgeted Project 0324-2016-0003 and the President of the Russian Federation project MK 6685.2015.4.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Bely A.E., Wray G.A. Molecular phylogeny of nauid worms (Annelida: Clitellata) based on cytochrome oxidase I. Mol. Phylogenet. Evol. 2004;30:50-63. DOI 10.1016/S1055-7903(03)00180-5.

- Blakemore R.J. Cosmopolitan earthworms – a global and historical perspective. *Annelids in Modern Biology*. Ed. D.H. Shain. 2009;257-283. DOI 10.1002/9780470455203.ch14.
- Blakemore R.J. Cosmopolitan Earthworms – an Eco-taxonomic Guide to the Peregrine Species of the World. Yokohama. VermEcology, 2012.
- Colgan D.J., Mclauchlan A., Wilson G.D.F., Livingston S.P., Edgecombe G.D., Macaranas J., Cassis G., Gray M.R. Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. *Aust. J. Zool.* 1998;46:419-437. DOI 10.1071/zo98048.
- Excoffier L., Laval G., Schneider S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. Online*. 2005;1:47-50.
- Fernández R., Almodóvar A., Novo M., Gutiérrez M., Díaz Cosín D.J. A vagrant clone in a peregrine species: phylogeography, high clonal diversity and geographical distribution in the earthworm *Aporrectodea trapezoides* (Dugès, 1828). *Soil Biol. Biochem.* 2011a;43:2085-2093. DOI 10.1016/j.soilbio.2011.06.007.
- Fernández R., Bergmann P., Almodóvar A., Cosín D.J.D., Heethoff M. Ultrastructural and molecular insights into three populations of *Aporrectodea trapezoides* (Dugès, 1828) (Oligochaeta, Lumbricidae) with different reproductive modes. *Pedobiologia*. 2011b;54:281-290. DOI 10.1016/j.pedobi.2011.04.003.
- Fernández R., Almodóvar A., Novo M., Simancas B., Díaz Cosín D.J. Adding complexity to the complex: New insights into the phylogeny, diversification and origin of parthenogenesis in the *Aporrectodea caliginosa* species complex (Oligochaeta, Lumbricidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 2012;64(2):368-379. DOI 10.1016/j.ympev.2012.04.011.
- Fernández R., Almodóvar A., Novo M., Gutiérrez M., Díaz Cosín D.J. Earthworms, good indicators for palaeogeographical studies? Testing the genetic structure and demographic history in the peregrine earthworm *Aporrectodea trapezoides* (Dugès, 1828) in southern Europe. *Soil Biol. Biochem.* 2013;58:127-135. DOI 10.1016/j.soilbio.2012.10.021.
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 1994;3:294-299.
- Garbar A.V., Vlasenko R.P., Mezhrzherin S.V. The comparative morphological analysis of diploid *Aporrectodea caliginosa* and triploid *A. trapezoides* earthworm species (Oligochaeta, Lumbricidae) in Ukraine. *Vestnik Zoologii = Herald of Zoology*. 2007;41:423-432. (in Russian)
- Giska I., Sechi P., Babik W. Deeply divergent sympatric mitochondrial lineages of the earthworm *Lumbricus rubellus* are not reproductively isolated. *BMC Evol. Biol.* 2015;15:217. DOI 10.1186/s12862-015-0488-9.
- Hendrix P.F., Baker G.H., Callahan M.A., Damoff G.A., Fragoso C., Gonzalez G., James S.W., Lachnicht S.L., Winsome T., Zou X. Invasion of exotic earthworms into ecosystems inhabited by native earthworms. *Biol. Invasions*. 2006;8:1287-1300. DOI 10.1007/s10530-006-9022-8.
- Hendrix P.F., Callahan M.A., Drake J.M., Huang C.-Y., James S.W., Snyder B.A., Zhang W. Pandora's box contained bait: the global problem of introduced earthworms. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 2008;39:593-613. DOI 10.1146/annurev.ecolsys.39.110707.173426.
- King R.A., Tibble A.L., Symondson W.O.C. Opening a can of worms: unprecedented sympatric cryptic diversity within British lumbricid earthworms. *Mol. Ecol.* 2008;17(21):4684-4698. DOI 10.1111/j.1365-294X.2008.03931.x.
- Martinsson S., Cui Y., Martin P.J., Pinder A., Quinlan K., Wetzel M.J., Erséus C. DNA-barcoding of invasive European earthworms (Clitellata: Lumbricidae) in south-western Australia. *Biol. Invasions*. 2015;17:2527. DOI 10.1007/s10530-015-0910-7.
- Martinsson S., Rhodén C., Erséus C. Barcoding gap, but no support for cryptic speciation in the earthworm *Aporrectodea longa* (Clitellata: Lumbricidae). *Mitochondrial DNA*. 2016. DOI 10.3109/19401736.2015.1115487.
- Michaelsen W. Die geographische Verbreitung der Oligochaeten. Berlin: Friedländer & Sohn, 1903.
- Omodeo P. Cariologia dei Lumbricidae. *Caryologia*. 1952;4:173-275.
- Perel T.S. Rasprostranennost' i zakonomernosti raspredeleniya dozhdevykh chervy fauny SSSR [Range and regularities in the distribution of earthworms in the USSR]. Moscow: Nauka Publ., 1979. (in Russian)
- Pérez-Losada M., Ricoy M., Marshall J.C., Domínguez J. Phylogenetic assessment of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* species complex (Oligochaeta: Lumbricidae) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2009;52:293-302. DOI 10.1016/j.ympev.2009.04.003.
- Porco D., Decaëns T., Deharveng L., James S.W., Skarzynski D., Erséus C., Butt K.R., Richard B., Hebert P.D.N. Biological invasions in soil: DNA barcoding as a monitoring tool in a multiple taxa survey targeting European earthworms and springtails in North America. *Biol. Invasions*. 2013;15:899-910. DOI 10.1007/s10530-012-0338-2.
- Shashkov M.P. Population demographic approaches to studies of earthworms in the forests of Kaluga Oblast. *Lesovedenie = Russian Journal of Forest Science*. 2016;1:55-64. (in Russian)
- Shekhovtsov S.V., Golovanova E.V., Peltek S.E. Invasive lumbricid earthworms of Kamchatka (Oligochaeta). *Zoological Studies*. 2014a;53:52. DOI 10.1186/s40555-014-0052-0.
- Shekhovtsov S.V., Golovanova E.V., Peltek S.E. Genetic diversity of the earthworm *Octolasion tyrtaeum* (Lumbricidae, Annelida). *Pedobiologia*. 2014b;57:245-250. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pedobi.2014.09.002>.
- Shekhovtsov S.V., Golovanova E.V., Peltek S.E. Different dispersal histories of lineages of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* (Lumbricidae, Annelida) in the Palearctic. *Biol. Invasions*. 2016a;18:751-761. DOI 10.1007/s10530-015-1045-6.
- Shekhovtsov S.V., Golovanova E.V., Peltek S.E. Cryptic genetic lineages in *Eisenia nordenskiöldi pallida* (Oligochaeta, Lumbricidae) Eur. J. Soil Biol. 2016b;75:151-156 DOI 10.1016/j.ejsobi.2016.06.004.
- Tiunov A.V., Hale C.M., Holdsworth H.M., Vsevolodova-Perel T.S. Invasion patterns of Lumbricidae into the previously earthworm-free areas of northeastern Europe and the western Great Lakes region of North America. *Biol. Invasions*. 2006;8:1223-1234. DOI 10.1007/s10530-006-9018-4.
- Vsevolodova-Perel T.S. Dozhdevye chervi Rossii: kadastr i opredelitel' [The earthworms of the fauna of Russia: cadaster and key]. Moscow: Nauka Publ., 1997. (in Russian)

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 20.04.2017. Формат 60 × 84 ¹/₈. Усл. печ. л. 11,16. Уч.-изд. л. 12,3.

Тираж 200 экз. Заказ № 101.

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